

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER
KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleichende molekulare Untersuchungen
syn- und metachroner kolorektaler Karzinome sowie
synchroner Magenkarzinome im Bezug auf
Chromosomale Instabilität und
Mikrosatelliten Instabilität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nicole Ulrich
aus Weiden

2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. med. Bernhard Weber

PD Dr. med. Frauke Bataille

Prof. Dr. med. Pompiliu Piso

02.03.2009

Meinen Eltern gewidmet
als Dank
für ihre stete Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	1
<u>1.1 Epidemiologie</u>	1
1.1.1 Dickdarmkarzinome	2
1.1.2 Magenkarzinome	3
<u>1.2 Ätiologische Faktoren</u>	5
1.2.1 Dickdarmkarzinome	5
1.2.2 Magenkarzinome	8
<u>1.3 Makro- und Histopathologie von Magen-/Dickdarmkarzinomen</u>	9
1.3.1 Kolonkarzinome	9
1.3.2 Magenkarzinome	11
1.3.3 Synchrone und metachrone Mehrfachkarzinome	15
<u>1.4 Molekulare Pathogenese von Magen-/Dickdarmkarzinomen</u>	16
<u>1.5 Fragestellung</u>	22
<u>II. Material</u>	24
<u>2.1 Laborgeräte</u>	24
<u>2.2 Chemikalien</u>	24
<u>2.3 Puffer und Lösungen</u>	25
<u>2.4 Primer</u>	27
<u>2.5 Gewebe</u>	28
2.5.1 Dickdarmkarzinome	29
2.5.1.1 Metachrone Dickdarmkarzinome	29
2.5.1.2 Synchrone Dickdarmkarzinome	30
2.5.2 Magenkarzinome	31
<u>III. Methoden</u>	32
<u>3.1 Gewinnung von DNA aus Paraffinblöcken</u>	32
3.1.1 Herstellung von Schnitten	32
3.1.2 Entparaffinieren der Gewebsschnitte	33
3.1.3 Manuelle Mikrodisektion der Gewebsschnitte	33
3.1.4 Reinigung genomischer DNA durch Proteinase-K-Verdau	34
<u>3.2 Amplifikation genomischer DNA durch die Polymerasekettenreaktion</u>	34
3.2.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion	34
3.2.2 Durchführung der DNA-Amplifikation	36

3.2.3 PEP-PCR	36
3.2.4 MSI-Panel	38
3.2.5 Vorbereitung für das ABI PRISM™	38
3.2.6 Ansätze weiterer Primer	39
3.2.7 ABI PRISM™	42
<u>3.3 Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen der</u>	
<u>Reaktionsansätze</u>	43
<u>3.4 Fehlerquellen bei ausbleibender Amplifikation</u>	44
<u>IV. Ergebnisse</u>	45
<u>4.1 Identifikation von Mikrosatelliten Instabilität (MSI)</u>	45
4.1.1 Mikrosatellitenanalyse unter Verwendung des Referenzpanels	46
4.1.2 Mikrosatellitenanalyse unter ausschließlicher Verwendung von	
elf Mikrosatelliten Markern auf Chromosom 5	49
<u>4.2 Identifikation von Loss of Heterozygosity (LOH)</u>	54
4.2.1 LOH-Analyse unter Verwendung des Referenzpanels	55
4.2.2 LOH-Analyse der Primer des Chromosom 5: Vergleich der	
metachronen, synchronen Kolon- und Magenkarzinome	57
<u>4.3 Zusammenhang von Instabilität, Lokalisation und Klassifikation</u>	61
4.3.1 Metachrone Dickdarmkarzinome	61
4.3.2 Synchroner Dickdarmkarzinome	65
4.3.3 Synchroner Magenkarzinome	68
<u>4.4 Mismatchreparaturgene</u>	70
4.4.1 Metachrone Kolondarmkarzinome	71
4.4.2 Synchroner Kolonkarzinome	71
4.4.3 Synchroner Magenkarzinome	71
4.4.4 Zusammenfassung der Immunhistologie	72
<u>4.5 Daten im Vergleich</u>	73
4.5.1 Metachrone Kolonkarzinome	73
4.5.2 Synchroner Kolonkarzinome	75
4.5.3 Synchroner Magenkarzinome	78
<u>4.6 MSI-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und dem APC-</u>	
<u>Primer (Referenzpanel, Chromosom 5)</u>	79
<u>4.7 LOH-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und dem</u>	
<u>APC-Primer (Referenzpanel, Chromosom 5)</u>	83

<u>V. Diskussion</u>	88
<u>5.1 Verteilung der Lokalisationen der meta-, synchronen Kolon- und Magenkarzinome im Darm</u>	88
5.1.1 Lokalisation der meta- und synchronen Kolonkarzinome	88
5.1.2 Lokalisation der meta- und synchronen Kolonkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten.	89
5.1.3 Lokalisation der synchronen Magenkarzinome	90
5.1.4 Lokalisation der synchronen Magenkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten	91
<u>5.2 Vergleich des Auftretens von MSI und LOH bei metachronen, synchronen Kolon- und Magenkarzinomen</u>	91
5.2.1 Mikrosatelliteninstabilität bei Kolonkarzinomen	92
5.2.2 Chromosomale Instabilität bei Kolonkarzinomen	94
5.2.3 Mikrosatelliteninstabilität bei Magenkarzinomen	95
5.2.4 Chromosomale Instabilität bei Magenkarzinomen	97
5.2.5 MSI-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und 5q21-q22 (APC-Primer, Referenzpanel, Chromosom 5).	98
5.2.6 LOH-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosoms 5 und 5q21-q22 (APC-Primer, Referenzpanel, Chromosom 5)	100
<u>5.3 Bethesda-Kriterien bei synchronen und metachronen Kolonkarzinomen</u> ...	101
<u>5.4 Unterschiedliche Wege bei der Karzinomentstehung</u>	104
<u>5.5 Möglichkeiten für die gastroenterologische Onkologie</u>	106
<u>VI. Zusammenfassung</u>	109
<u>VII. Literaturverzeichnis</u>	113
<u>VIII. Anhang</u>	126
<u>8.1 Abkürzungsverzeichnis</u>	126
<u>8.2 Lebenslauf</u>	128
<u>8.3 Danksagung</u>	129

I. Einleitung

Bereits 1895 begann die Suche nach einer Verbindung von familiärer Disposition und Krebserkrankung: Der Pathologe Alfred S. Warthin (Universität von Michigan, Ann Arbor, USA) fragte seine Schneiderin nach dem Grund ihrer Traurigkeit, woraufhin diese ihre Sorge äußerte, an Unterleibs- oder Darmkrebs zu sterben, da bereits viele ihrer Verwandten an diesen Krebserkrankungen verstorben seien, und sie fürchte, das gleiche Schicksal zu erleiden. – Sie starb in jungen Jahren an einem Endometriumkarzinom¹.

Daraufhin erforschte Dr. Warthin den Stammbaum seiner Schneiderin, der „Familie G“, und stellte fest, dass ein Großteil ihrer Verwandten an Magen- oder Endometriumkarzinomen litten und deswegen operiert oder verstorben waren².

Ein halbes Jahrhundert später erforschte Henry T. Lynch und seine Mitarbeiter zwei Krebsfamilien und entdeckten, dass das kolorektale Karzinom besonders häufig auftrat, und die Familien darüber hinaus eine signifikant hohe Inzidenz an extrakolischen Karzinomen, besonders des Magens und Endometriums aufwiesen³. Diese Befundkonstellation wurde als Lynch-Syndrom oder Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) bezeichnet, da sie im Gegensatz zur Familiären Adenomatösen Polypose (FAP) nicht durch einen ebenso auffälligen Phänotypus geprägt war.

Erst gegen Ende der achtziger Jahre gelang es, Erkenntnisse auf dem molekularbiologischen Sektor mit den klinisch-pathologischen Beobachtungen zu verknüpfen.

1990 erfolgte schließlich, erarbeitet von der „International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“, die Definition des HNPCC-Syndroms nach den „Amsterdam-Kriterien“⁴.

1.1 Epidemiologie

Unter den malignen Karzinomen des Gastrointestinaltraktes gehören Magen- und Darmkrebs zu den häufigsten Erkrankungen, besonders des höheren Lebensalters.

1.1.1 Dickdarmkarzinome

In der Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland (Statistisches Bundesamt) stehen die kolorektalen Karzinome an zweiter Stelle aller bösartigen Neubildungen und sind die häufigsten malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes.

Morbiditäts- und Todesursachenstatistik:

Etwa 50.000 Menschen erkranken jährlich an einem kolorektalen Karzinom mit steigender Inzidenz (24,1/100.000 Einwohner/Jahr in Deutschland und 14,7/100.000 Einwohner/Jahr in Bayern⁵). Die Sterbefälle je 100.000 Einwohner am kolorektalen Karzinom sind von 1998 mit 33,5/100.000 auf 26,7/100.000 im Jahr 2006 rückläufig (Statistisches Bundesamt, 2007).

In der Oberpfalz nimmt das Dickdarmkarzinom mit 7,72% der bösartigen Neubildungen den zweiten Rang nach dem Mammakarzinom (18,98%) ein. Das Rektumkarzinom liegt mit 6,08% an fünfter Stelle (Tumorzentrum Regensburg, 2001).

Im Tumorzentrum Regensburg wurden von 1998 bis 2003 insgesamt 2707 Kolonkarzinome, 217 rekto-sigmoidale Karzinome und 960 Rektumkarzinome dokumentiert (Summe der jeweiligen Neuerkrankungen; Tumorzentrum Regensburg, 2006).

Alters- und Geschlechtsverteilung:

Vor dem 40. Lebensjahr sind kolorektale Karzinome selten (2,2-4,5% aller kolorektalen Karzinome⁶), meist sind über 50-jährige betroffen, wobei sich die Inzidenz bei über 40-jährigen zehnjährlich verdoppelt.

Von Kolonkarzinomen sind Frauen und Männern annähernd gleich häufig betroffen, dagegen überwiegen Rektumkarzinome bei Männern⁷. Beim Mann ist es das dritthäufigste Karzinom nach dem Bronchial- und Prostatakarzinom, bei Frauen steht es an dritter Stelle nach bösartigen Neubildungen der Brustdrüse und nach Karzinomen von Bronchien und Lunge.

2001 sind in der Oberpfalz 8,68% der Männer und 6,83% der Frauen an einem Kolonkarzinom erkrankt, 7,93% beträgt der Anteil an Männern und 4,39% an Frauen in der Oberpfalz mit bösartigen Neubildungen des Rektum (Tumorzentrum Regensburg, 2001).

Das mittlere Diagnosealter in Bayern für bösartige Neubildungen des Kolon betrug zwischen 1992 und 2003 66 Jahre bei Männern und 69 Jahre bei Frauen (Tumorzentrum Regensburg, 2006). Bei bösartigen Neubildungen des Rektum und Rektosigmoid lag das mittlere Diagnosealter bei Männern bei 64 Jahren und bei Frauen bei 66 Jahren (Tumorzentrum Regensburg, 2006).

Geographische Unterschiede:

Die Inzidenz der kolorektalen Karzinome weist geographische Unterschiede auf: So treten diese besonders häufig in westlichen Industriestaaten mit hoher Urbanisation („Typ USA“) auf. In den Agrarstaaten mit geringerem sozioökonomischen Niveau („Typ Zentralafrika“) sind sie hingegen selten (vgl. auch Kapitel 1.2.1). Dies zeigen die standardisierten Jahresinzidenzzahlen in den USA von $30/10^5$, in Mitteleuropa von $15-20/10^5$, in Japan und Osteuropa von $10/10^5$ gegenüber Zentralafrika mit $1/10^5$ Betroffenen⁸.

Rassische Faktoren:

Die in der Literatur gut dokumentierten geographischen Häufigkeitsunterschiede kolorektaler Karzinome lassen sich im wesentlichen auf die unterschiedlichen geographischen Lebensgewohnheiten, kaum jedoch auf Einflussfaktoren verschiedener Rassen zurückführen: Hierauf weisen Ergebnisse von Migrationsstudien hin, in welchen gezeigt werden konnte, dass Einwanderer bereits nach einer Generation die identischen Inzidenzzahlen wie die einheimische Bevölkerung aufweisen.

1.1.2 Magenkarzinome

Das Magenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Magens und das zweithäufigste Neoplasma des Gastrointestinaltraktes.

Morbiditäts- und Todesursachenstatistik:

In Deutschland beträgt die Inzidenz jährlich ca. $20/100.000$ Einwohner⁹. 13.132 Patienten verstarben im Jahr 2000 daran: $14,4/100.000$ deutschlandweit und $14,7/100.000$ in Bayern; insgesamt 10.923 Menschen ($10,8/100.000$) verstarben 2006 in Deutschland am Magenkarzinom (Statistisches Bundesamt, 2007). Es steht somit in der Todesursachenstatistik an dritter Stelle der Karzinomerkrankungen der

Verdauungsorgane (erste Stelle: bösartige Neubildungen des Dickdarms, zweite Stelle: bösartige Neubildungen des Pankreas).

1993 veröffentlichte die „International Agency for Research on Cancer“ (IARC), eine Organisation der WHO, dass sowohl Inzidenz als auch Mortalität des Magenkarzinoms in den Ländern der Europäischen Gemeinschaft niedriger als im übrigen Europa, und zwischen 1970 und 1985 rückläufig waren¹⁰.

So auch in der BRD (alte Länder), in welcher die Zahl an Sterbefällen an bösartigen Neubildungen des Magen in den Jahren 1970/1977/1980 von 23.815/19.265 auf 18.045 absank. Auch in den letzten Jahren waren die Sterbefälle an bösartigen Neubildungen des Magens weiter rückläufig: Von 13.821 im Jahr 1998 auf 10.923 im Jahr 2006 (Statistisches Bundesamt, 2007)

In der Oberpfalz (Zahlen des Tumorzentrums Regensburg, 2001) nimmt das Magenkarzinom mit einer Gesamtzahl von 4,01% den neunten Rang der bösartigen Neubildungen ein, wobei 4,82% der Männer und 3,27% der Frauen betroffen sind.

Von 1992-2003 dokumentierte das Tumorzentrum Regensburg 2325 Neuerkrankungen an Magenkarzinomen für den Wohnort Bayern (Tumorzentrum Regensburg, 2006).

Alters- und Geschlechtsverteilung:

Magenkarzinome treten hauptsächlich nach dem 50. Lebensjahr auf, nur etwa 5% der Patienten sind jünger als 40 Jahre¹¹.

Eine Erkrankung vor dem 30. Lebensjahr ist selten (die jüngsten Fälle wurden im ersten und zweiten Lebensjahr beschrieben, ein Siegelringkarzinom bei einem zwölfjährigen Jungen¹²), steigt mit zunehmendem Lebensalter jedoch an. Bei einer Multizenterstudie in Deutschland wurde ein mittleres Erkrankungsalter von 62,3 Jahren ermittelt¹³. Das mittlere Diagnosealter von 1992-2003 lag bei Männern bei 66 Jahren und bei Frauen bei 68 Jahren für Neuerkrankungen in Bayern (Tumorzentrum Regensburg, 2006).

Das Geschlechtsverhältnis war 1991 in der Todesursachenstatistik für die alte BRD mit fast 1:1 beinahe ausgeglichen, wohingegen es 1965 noch 1,2:1 (m:w) betrug. Ausgeglichen oder zu Gunsten des weiblichen Geschlechtes verschoben (1-1,2:1) ist das Geschlechtsverhältnis bei unter 35-jährigen¹⁴. Ähnlich war auch bei allen vom Tumorzentrum Regensburg seit 1992 erfassten Patienten in der Oberpfalz das Geschlechtsverhältnis beinahe ausgeglichen oder leicht zu Ungunsten der Männer verschoben (Tumorzentrum Regensburg, 2006). Weltweit erkranken Männer etwa doppelt so häufig am Magenkarzinom wie Frauen¹⁵.

Geographische Unterschiede:

Die hohe Inzidenz von 65/100.000 Männern in Japan zur Einführung von Gastroskopen als Screeningmethode geführt¹⁶.

Auch Teile Südamerikas (v.a. Costa Rica und Chile) sowie einige osteuropäische Staaten wie Polen, Ungarn oder die Tschechei, sind, wie Japan (Mortalität etwa doppelt so hoch wie in Deutschland), ebenso häufig betroffen. Selten tritt das Magenkarzinom hingegen in Australien, Kuba, Kanada und den USA (Inzidenz 8/100.000 Einwohner¹⁷) auf (vgl. auch Kap. 1.2.2).

Rassische und ethnische Faktoren:

Angehörige der gelben Rasse, wie die Bevölkerung Japans, zeigen im Gegensatz zu Mitgliedern der schwarzen Rasse (schwarze Bevölkerung der USA) eine höhere Erkrankungsrate.

Jedoch gleicht sich bei Einwanderern aus Ländern mit hoher Karzinominzidenz in solche mit niedriger Inzidenz, die Karzinomquote meist innerhalb der folgenden ein bis zwei Generationen an diejenige des neuen Heimatlandes an¹⁸.

1.2 Ätiologische Faktoren**1.2.1 Dickdarmkarzinome***Diätetische Faktoren:*

Ebenso wie beim Magenkarzinom sind auch beim kolorektalen Karzinom Ernährungsgewohnheiten wie fleischreiche, ballaststoffarme und fettreiche Kost Risikofaktoren.

Genetische Faktoren / HNPCC-Syndrom:

Das autosomal-dominant vererbte Lynch-Syndrom (HNPCC-Syndrom) zählt zu den „cancer family syndromes“.

Entscheidend für die Aufklärung der molekularen Ursache des HNPCC-Syndroms war 1992 die Entdeckung von Veränderungen im Bandenmuster von DNA aus Karzinomgewebe im Vergleich zu DNA aus Normalgewebe¹⁹. Diese Alterationen wurden 1993 von mehreren Forschergruppen identifiziert und als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. als Replication-Error-Phenotype (RER+) bezeichnet^{85, 20, 21}.

Fishel et al.²² konnten 1993 zudem zeigen, dass eine Keimbahnmutation im hMSH2 Gen, einem Mismatch-Repair-Gen, eine wesentliche molekulare Ursache des HNPCC-Syndroms darstellt.

Mit dem Marker D2S123 gelang es, auf Chromosom 2p15-16, die beschriebene Mutation des Mikrosatellitenloci eindeutig mit dem HNPCC-Syndrom zu verbinden²³. (siehe hierzu auch Kap. 1.4)

Literaturdaten belegen, dass Träger einer Keimbahnmutation ein 80%-iges Risiko haben im Laufe ihres Lebens ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Die molekulare Diagnose „HNPCC“ lässt sich bei ca. 70% der Patienten durch den Nachweis einer Keimbahnmutation in einem der bislang mindestens sechs bekannten DNA-Mismatch-Reparatur-Genen (aus Blut-DNA) stellen und ermöglicht zugleich, bei nicht erkrankten Familienmitgliedern, eine prädiktive Diagnostik einzuleiten²⁴.

HNPCC - Definition, Klinik und Molekulargenetik:

Diagnostische („Amsterdam“) Kriterien^{4, 25}:

- Drei oder mehr Verwandte mit histologisch gesichertem KRK (Amsterdam I), oder mit HNPCC-assoziiertem Karzinom/Tumor (Kolon/Rektum, Endometrium, Magen, Ovar, Dünndarm, Nierenbecken/Ureter, Gehirn; Amsterdam II)
- Davon mindestens ein erstgradig Verwandter
- KRK in mindestens zwei Generationen
- Ein Betroffener jünger als 50 Jahre
- Ausschluss einer Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP)

	<i>HNPCC</i>	<i>Sporadisch</i>
Häufigkeit (%)	5-10%	90%
Alter (Jahre)	34-45	65-75
Adenomzahl	1-5	<10
Ca-Lokalisation	70% proximal	40% Rektum
MSI hoch positiv ^{26, 27}	>90%	15%
Keimbahnmutation	Ca. 70%, hMSH2 (2p22), hMLH1 (3p21), seltene Gene: hMSH6, PMS1 u.2	Polygen, multifaktoriell

Tabelle 1: HNPCC und sporadische Karzinome im Vergleich

Eine Besonderheit des HNPCC-Syndroms ist, dass in den betroffenen Familien nicht nur kolorektale Karzinome auftreten (sog. Lynch-I-Syndrom), sondern auch ein erhöhtes Risiko besteht, andere extrakolische Karzinome zu entwickeln (sog. Lynch-II-Syndrom). Diese Karzinome manifestieren sich in Form von Endometriumkarzinomen, Karzinomen des Harntraktes, Magens und des Ovars²⁸.

Sind die Amsterdam-Kriterien I oder II familienanamnestisch erfüllt, so ist der Patient klinisch – unabhängig davon, ob eine Keimbahnmutation identifiziert werden kann – ein HNPCC-Patient und entsprechend vor- und nachzusorgen.

Die folgenden Bethesda-Kriterien definieren Patienten, die einem HNPCC-Screening zugeführt werden sollen. Hierbei definiert das erste Kriterium klinisch einen HNPCC-Patienten. Die Kriterien zwei bis sechs sind ohne auffällige Ergebnisse im HNPCC-Screening dann nicht weiter verdächtig auf HNPCC:

Bethesda-Kriterien:

1. Krebskranke Individuen aus Familien, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen
2. Individuen mit mindestens zwei syn- oder metachronen HNPCC typischen Karzinomen: Kolorektum, Endometrium, Ovar, Magen, Leber, Gallenwege, Dünndarm, Nierenbecken, Ureter
3. Personen mit kolorektalen Karzinomen (KRK) und einem erstgradig Verwandten mit KRK oder HNPCC typischen extrakolischen Karzinom und/oder kolorektalem Adenom, wenn eines der Karzinome vor dem 45. oder das Adenom vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert worden sind.
4. Unter 45 Jahre alte Personen mit KRK oder Endometriumkarzinom
5. Individuen mit rechtsseitigem KRK mit histopathologisch undifferenziertem Erscheinungsbild (solid-cribriformes Wachstumsmuster) oder siegelringzelliger Differenzierung
6. Unter 40 Jahre alte Personen mit kolorektalen Adenomen

Bethesda-Kriterien, modifiziert (gültig ab 2003)^{29, 30}:

Identifikation von Patienten mit v.a. HNPCC, deren Karzinome auf MSI untersucht werden sollten. Ein Kriterium muss erfüllt sein:

- Patient mit:
1. Kolorektalem Karzinom (KRK) vor dem 50. Lebensjahr
 2. Syn- oder metachronen KRK oder anderen HNPCC-assoziiertem Karzinom (ohne Altersbegrenzung)
 3. KRK mit MSI-H-typischer Morphologie vor dem 60. Lebensjahr
 4. KRK und einem oder mehreren erstgradig Verwandten mit KRK oder HNPCC-assoziiertem Karzinom, wobei ein Karzinom vor dem 50. oder ein KR-Adenom vor dem 40. Lebensjahr aufgetreten ist
 5. KRK und zwei oder mehreren Verwandten mit KRK oder HNPCC-assoziiertem Karzinom (ohne Altersbegrenzung)

1.2.2 Magenkarzinome

Alimentäre Risikofaktoren:

Risikofaktoren für die Entstehung eines Karzinoms des Magens sind gepökeltes, geräuchertes und gegrilltes Fleisch oder ebenso zubereiteter Fisch. Auch kohlenhydratreiche Ernährung scheint das Karzinomrisiko zu erhöhen³¹.

Wohingegen der Einfluss einer proteinreichen oder -armen Ernährung für die Entstehung des Magenkarzinoms umstritten ist.

Frisches Obst, insbesondere Zitrusfrüchte, Gemüse, ballaststoffreiches Brot und die hohe Zufuhr von Vitamin C und Karotin reduzieren im Gegensatz dazu das Magenkrebsrisiko³².

Chemische Risikofaktoren:

Zigaretten- und Pfeifenrauchen steigern das Magenkrebsrisiko³³.

Sozioökonomischer Status:

Bei der Landbevölkerung, bei städtischen Industriearbeitern, sowie bei Personen mit niedrigem sozio-ökonomischen Standard, ist das Magenkrebsrisiko erhöht. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass weitere Risiken, wie schlechtere Ernährung, niedriger hygienischer Standard oder verstärkter Kontakt mit Umweltgiften mit niedrigem sozio-ökonomischen Standard verbunden sein können.

Bakterielle Ursachen:

Karzinogene N-Nitrosoverbindungen können bei bakterieller Besiedlung atrophischer Mägen mit Hypochlorhydrie entstehen, indem vorhandene Bakterien mit der Nahrung aufgenommene Nitrate zu Nitriten reduzieren. Diese reagieren wiederum mit weiteren stickstoffhaltigen Substanzen (Amiden) wie sie in der Nahrung, Medikamenten oder Gallensäuren vorkommen, unter Bildung karzinogener und mutagener N-Nitrosoverbindungen³⁴, welche eine wichtige Rolle bei der Entstehung der intestinalen Metaplasien zu spielen scheinen.

Zwischen dem Bakterium *Helicobacter pylori* und Magenkarzinomen, besonders hochdifferenzierten Karzinomen vom intestinalen Typ^{32, 35, 36}, besteht ebenfalls eine Verbindung. Das erhöhte Risiko bleibt jedoch auf Antrum, Korpus und Fundus beschränkt, gastroösophageale und Kardiakarzinome sind davon ausgenommen³².

Der Weg von der Infektion bis hin zum Karzinom beginnt mit einer verstärkten Epithelproliferation³⁷. In einem nächsten Schritt verursachen entzündungsassoziierte und/oder diätetische Mutagene pathologische Mutationen. Die entstandenen Replikationsfehler werden mit zunehmender Dauer der Entzündung und steigendem Lebensalter nicht mehr behoben, so dass auf dem Weg über die intestinale Metaplasie und die Dysplasie dann das Magenkarzinom entsteht.

Dennoch mündet nur ein kleiner Teil der Infektionen in die Karzinogenese ein: Das Entartungsrisiko wird bei einer seit 15 bis 20 Jahren bestehenden chronisch-atrophen Gastritis mit 8-13% angegeben. So lässt sich die Zeitspanne zwischen Infektion und Karzinomentstehung etwa auf 40 Jahre schätzen, wobei die ersten 20 Jahre von der Infektion zur persistierenden Gastritis, die zweiten 20 Jahre bis zur Entstehung der Dysplasie und des Karzinoms vergehen.

1.3 Makro- und Histopathologie von Magen-/Dickdarmkarzinomen**1.3.1 Kolonkarzinome**

In Rektum und Sigma sind über die Hälfte aller kolorektalen Karzinome lokalisiert.

Diese erscheinen makroskopisch polypös, schüsselförmig ulzerierend mit wallartiger Randverdickung oder diffus infiltrativ (szirrhöses Karzinom) wachsend, mikroskopisch liegen zu 95% Adenokarzinome vor. Des Weiteren werden muzinöse Adenokarzinome (>50% der Karzinommasse weisen eine muzinöse Komponente auf),

Siegelringzellkarzinome, Plattenepithel-, adenosquamöse-, kleinzellige- und undifferenzierte Karzinome unterschieden.

Tabelle 2: Die Einteilung der kolorektalen Karzinome erfolgt nach der *TNM*- oder der *DUKES-Klassifikation*:

<i>TNM-Klassifikation</i>		<i>DUKES-Klassifikation</i>
T1	Karzinom infiltriert Submukosa	A
T2	Muscularis propria befallen	A
T3	Infiltration der Subserosa oder des nicht peritonealisierten Fettgewebes	B
T4	direkte Infiltration anderer Organe und/oder Perforation des viszerale Peritoneums	B
N1-2	angrenzende Lymphknoten befallen (N1 1-3, N2 \geq 4 regionale Lymphknoten)	C
M1	Fernmetastasen	

Das histologische Grading ergänzt das TNM-System unter prognostischen Gesichtspunkten. Demnach werden nach der WHO-Klassifikation gut- und mittelgradig differenzierte Karzinome (G1, G2) als „low grade of malignancy“, schlecht differenzierte Adenokarzinome (G3), Siegelringzellkarzinome sowie das undifferenzierte und kleinzellige Karzinom (G4) als „high grade of malignancy“ eingeteilt³⁸.

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach UICC (2002):

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tumorausbreitung:

Die Ausbreitung des Kolonkarzinoms erfolgt kontinuierlich *lymphogen* oder *hämatogen* in die Leber (Pfortader-Typ).

Betroffen sind die parakolischen, pararektalen, paraaortalen Lymphknoten, sowie diejenigen, welche entlang des Stammgefäßes lokalisiert sind.

Inguinale Lymphknotenmetastasen können beim Rektumkarzinom auftreten. Die Frequenz lymphonodulärer Metastasen korreliert hierbei mit der Tiefeninfiltration des Karzinoms. So erfolgt die Metastasierung lageabhängig bei Karzinomen des oberen Rektumdrittels nach kranial, im mittleren Drittel auch nach lateral und bei Karzinomen des unteren Drittels nach distal und inguinal³⁹. Das tiefsitzende Rektumkarzinom metastasiert als Cava-Typ in die Lunge.

Nach Ergebnissen der „Studiengruppe kolorektales Karzinom“ sind in etwa 27% nach einer primär kurativen Erstoperation Fernmetastasen zu erwarten, welche sich zu 59-66% in der Leber befinden. Beim Kolonkarzinom finden sich zu 25% weitere peritoneale und zu 17% bronchopulmonale Filiae. Zu 26% ist die Lunge beim Rektumkarzinom betroffen³⁹.

Prognose:

Eine kurative Behandlung dieser meist erst spät diagnostizierten Karzinome ist nur durch die komplette chirurgische Karzinomentfernung möglich.

Karzinomausbreitung (TNM-Stadium) und Residualtumorsituation (R-Klassifikation) sind derzeit die wichtigsten Prognosefaktoren. Weitere Faktoren sind Angioinvasion, perineurale Tumorausbreitung und Differenzierungsgrad (Grading) des Karzinoms; klinisch bedeutsam sind darüber hinaus Alter, Geschlecht (Männer: schlechtere Prognose) sowie Begleiterkrankungen³⁸.

1.3.2 Magenkarzinome

Magenkarzinome sind vor allem in Antrum und Pylorus lokalisiert.

Das fortgeschrittene Magenkarzinom wächst makroskopisch (in Anlehnung an die Borrmann-Klassifikation) polypös (Typ I = 6%), schüsselförmig ulzerierend (Typ II = 23%), unscharf begrenzt ulzerierend (Typ III = 41%) oder diffus-infiltrativ (Typ IV = 30%)^{40, 41}. Die relative Häufigkeit der einzelnen Formen variiert in den verschiedenen Statistiken – der Typ I ist im Allgemeinen am seltensten.

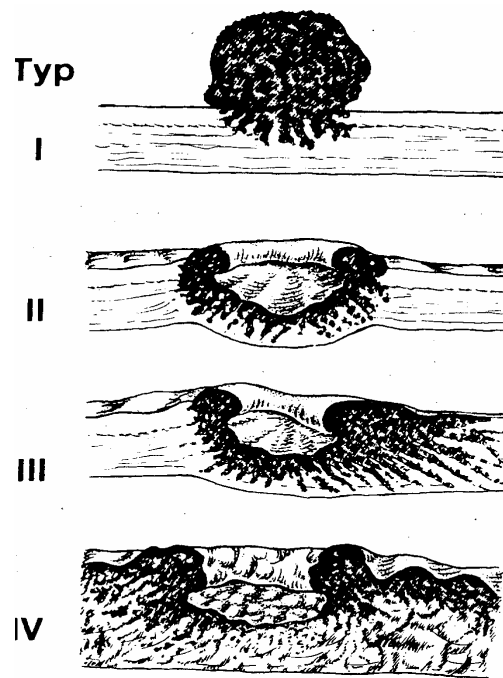


Abbildung 1: Makroskopische Typen des Magenkarzinoms nach Borrmann.
(nach: Remmele W. (Hrsg.), *Pathologie 2 Verdauungstrakt*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S.331/Abb.3.67)

Mikroskopisch liegt meist ein Adenokarzinom vor. Diese werden je nach vorherrschenden Anteilen als papillär, tubulär (43%), muzinös (>50% extrazelluläre Schleimbildung) oder siegelringzellhaltig (>50% Karzinomzellen mit intrazytoplasmatischen Muzin) (16%) differenziert. Des Weiteren unterteilt man in adenosquamöse, kleinzellige, undifferenzierte (18%) und Plattenepithelkarzinome⁴¹.

Tabelle 4: Die Einteilung erfolgt mittels der *TNM-Klassifikation* (UICC, 01.01.2003⁴²):

pTX	Tumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ (intraepithelial, ohne Infiltration der Lamina propria)
pT1	Lamina propria (Mukosatyp Ia) oder Submukosa (Submukosatyp Ib) befallen
pT2	Infiltration der Muscularis propria (IIa), Infiltration der Subserosa (IIb)
pT3	Serosa befallen (viscerales Peritoneum), ohne Infiltration von Nachbarorganen
pT4	benachbarte Strukturen infiltriert
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	kein Hinweis auf Lymphknotenbefall
N1	regionärer Lymphknotenbefall (1-6 Lymphknoten)
N2	regionärer Lymphknotenbefall (7-15 Lymphknoten)
N3	>15 Lymphknoten befallen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

(Regionäre Lymphknoten: perigastrisch entlang der kleinen und großen Kurvatur, den Aa. gastrica sinistra, hepatica communis, lienalis, coeliaca und hepatoduodenal)

Das *Magenfrühkarzinom* ist als Karzinom definiert, welches nur die Mukosa bzw. Mukosa und Submukosa infiltriert – unabhängig vom Lymphknotenbefall (Lymphknotenmetastasen <5% beim Mukosa-, bis 20% beim Submukosatyp).

Tabelle 5: Die *Laurén-Klassifikation* (1965)⁴³ orientiert sich am histologischen Wachstumsmuster:

<i>Intestinaler Typ</i>	Karzinom mit drüsigen Strukturen und Schleimproduktion, expansives Wachstum – bessere Prognose
<i>Diffuser Typ</i>	Karzinom mit dissoziiert liegenden Zellen und undifferenzierten Strukturen, invasives Wachstum mit Lymph- und Gefäßeinbrüchen – schlechtere Prognose

Der intestinale Typ ist etwa zwei- bis dreimal häufiger als der diffuse Typ.

4-16% der Magenkarzinome lassen sich nicht in eine der beiden Kategorien einordnen.

Tabelle 6: Die Karzinombegrenzung zum umgebenden Gewebe wird in der Magenkarzinomklassifikation nach Ming (1977)⁴⁴ berücksichtigt:

<i>expansiver Typ</i>	relativ gut begrenzt – „pushing margin“
<i>infiltrativer Typ</i>	Karzinom geht in die Umgebung über – „infiltrating margin“

Die meisten expansiven Formen nach Ming gehören dem intestinalen Typ nach Laurén an, wohingegen die meisten infiltrativen Formen nach Ming dem diffusen Typ nach Laurén zugeordnet werden können⁴⁵.

Wachstumsverhalten und Prognose des Karzinoms werden vom Differenzierungsgrad beeinflusst, welcher nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation in drei Stufen eingeteilt wird⁴⁶:

<i>G 1: Hochdifferenziert</i>	Adenokarzinom mit regulärer Drüsenstruktur, geringe Malignität
<i>G 2: Mitteldifferenziert</i>	Grad zwischen hoher und niedriger Differenzierung
<i>G 3: Wenig differenziert</i>	Adenokarzinom mit hochgradig irregulären, schlecht identifizierbaren Drüsen

Tabelle 7: Grading

Tumorausbreitung:

Die Nachbarorgane, wie Leber, Milz und Pankreas, werden *per continuitatem* infiltriert. *Lymphknotenmetastasen* (60-83% der Operationspräparate) finden sich, abhängig von der Lokalisation des Primärkarzinoms, in den regionalen Lymphknoten der kleinen und großen Kurvatur, der Leberpforte und der Pankreasumgebung⁴⁷. In die supraklavikulären Lymphknoten (Virchow-Drüse) metastasieren Karzinomzellen, welche in den Ductus Thoracicus gelangt sind.

Hämatogen erfolgt die Metastasierung zu 40-50% in die Leber, zu ca.10-20% in Lunge und Pleura und zu ca. 10-15% in die Nebennieren sowie in das Skelett.

Kavitär erfolgt die *peritoneale* Metastasierung (20-25% Serosa des Peritoneums).

Als *Krukenberg-Tumore* werden Ovarialmetastasen, die vor allem bei Siegelringzellkarzinomen auftreten, bezeichnet.

Prognose:

Die Prognose des Magenkarzinoms ist von mehreren Faktoren abhängig, so ist einer der wichtigsten Parameter das durch die TNM-Klassifikation festgelegte Tumorstadium⁴⁸.

Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt in den westlichen Ländern zwischen drei und 50%, in Japan, auf Grund von Screeninguntersuchungen und größerer Operationsradikalität, hingegen 46-60%⁴⁹. Erfolgt eine kurative Resektion, beträgt auch in den westlichen Ländern die Fünfjahresüberlebensrate im Stadium I und II 80-90%, im Stadium III nur noch 15-20% und im Stadium IV unter 5%⁵⁰.

Patienten mit Lymphknotenmetastasen im Kompartiment I (umfasst alle direkt an der kleinen und großen Kurvatur des Magens lokalisierten Lymphknoten) erreichen eine Fünfjahresüberlebensrate von 25%, ohne Lymphknotenmetastasen hingegen 66,7%.

Von allen anatomischen Lokalisationen des Magenkarzinoms weist das Kardiakarzinom die schlechteste Prognose auf⁵¹.

1.3.3 Synchrone und metachrone Mehrfachkarzinome

Synchrone Mehrfachkarzinome (primäre Multiplizität) werden beim kolorektalen Karzinom zwischen 1,6% und 6,9% gefunden, wobei etwa 75% dieser Mehrfachkarzinome im Rektum und Sigma lokalisiert sind⁵².

Metachrone Mehrfachkarzinome treten in 1,7%-7,0% auf; diese sind zu über 50% im proximalen Kolon (Caecum, Colon ascendens und transversum) gelegen^{53, 54}.

Die Wahrscheinlichkeit, nach operativer Entfernung eines kolorektalen Karzinoms ein zweites zu entwickeln, ist relativ hoch: So tritt bei 11% aller Patienten, welche einen ersten Eingriff fünf Jahre überlebt haben, ein Zweitkarzinom auf⁵⁵.

HNPCC prädisponiert zu synchronen und metachronen Kolonkarzinomen. So weisen 18% der Patienten bei Diagnosestellung ein synchrones Karzinom auf und 24% erkranken an einem metachronen Kolonkarzinom⁵⁶.

In einer chinesischen Studie⁵⁷ über Mehrfachkarzinome (20 Fälle in einem Zeitraum von 20 Jahren) wurde eine Inzidenz von 2,09% (20/959) ermittelt, davon waren sieben Fälle synchrone und 13 Fälle metachrone kolorektale Karzinome. Die Fünfjahresüberlebensrate dieser Patienten mit syn- (7/20) und metachronen (13/20) Karzinomen, welche in den letzten 20 Jahren behandelt worden waren, betrug 100% bei synchronen Karzinomen (4/4) und 83,3% (10/12) bei metachronen Karzinomen. (Keine Angabe von Tumorstadien; Artikel chinesisch, Zusammenfassung englisch)

In einer weiteren Studie⁵⁸ von 1993 aus der Genfer Region, über einen Zeitraum von 1970 bis 1986, betrug die Inzidenz von synchronen kolorektalen Karzinomen 1.1%, die von metachronen Karzinomen 1%. Zudem wurde eine hohe Assoziation von adenomatösen Polypen mit multiplen kolorektalen Karzinomen beobachtet. Die Fünfjahresüberlebensrate nach kurativer Resektion betrug 87% bei metachronen und 33% bei synchronen Karzinomen.

Mehrfachkarzinome des Magens werden bei 5-15% der Patienten gefunden^{59, 60}. Darüber hinaus berichten Esaki et al.⁶¹, dass Mehrfachkarzinome oft makroskopische und mikroskopische Ähnlichkeiten aufweisen, was die Autoren auf ähnliche Wege der Tumorentstehung zurückführen.

Nachdem MSI als molekularer Marker für kolorektale Karzinome identifiziert worden ist, haben Miyoshi E. et al.⁶² MSI Analysen bei Magen-Mehrfachkarzinomen durchgeführt: Sie wählten ein Patientenkollektiv von 78 Patienten, bei welchen im Beobachtungszeitraum von 1992-1999 in 33% synchrone und in 18% metachrone Karzinome auftraten. Sie fanden eine signifikant höhere Frequenz von niedriger Mikrosatelliteninstabilität in Mehrfachkarzinomen gegenüber Einfachkarzinomen mit MSI-L in 8% der solitären Karzinome, zu 27% der synchronen und 43% der metachronen Karzinome. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass Patienten mit instabilen Mikrosatelliten eine signifikant höhere Anzahl an Zweitkarzinomen entwickelten.

1.4 Molekulare Pathogenese von Magen-/Dickdarmkarzinomen

Karzinome entstehen durch Akkumulation genetischer Veränderungen überwiegend in Genen, die Schlüsselpositionen im Zellzyklus und bei der Zelldifferenzierung innehaben.

So können auch normale Zellen Proto-Onkogene (c-onc) enthalten, welche mit retroviralen Onkogenen (v-onc) übereinstimmen. Diese Proto-Onkogene und ihre Genprodukte haben Einfluss auf die zelluläre Wachstumsregulation und können bei der Karzinomentstehung aktiviert werden⁶³.

Beim Magenkarzinom liegen häufig Mutationen und/oder Amplifikation und Überexpression verschiedener Proto-Onkogene wie c-K-ras, c-erb und anderer Wachstumsfaktoren, sowie verschiedener Tumorsuppressorgenen vor^{64, 65}. Hiervon sind

insbesondere die Chromosomen 5q (APC-Gen), Chromosom 17p (p53-Gen) und 18q (DCC-Locus) besonders betroffen⁶⁶.

Adenom- Karzinom-Sequenz:

1974 bezeichnete Morson den histomorphologisch und makroskopisch fassbaren Prozess der Tumorentwicklung vom Kolonadenom (präkanzeröse Läsion) zum invasiven kolorektalem Karzinom als „Adenom-Karzinom-Sequenz“^{67,68}:

So weisen Adenome und Karzinome gleiche topographische Verteilungsmuster auf und kommen überzufällig häufig nebeneinander in gleichen anatomischen Darmregionen vor. Häufig lässt sich sogar der Übergang eines Adenoms in ein Karzinom noch erkennen, da letztere noch Adenomreste im Randbereich enthalten. Auch liegen bei Adenomträgern und Karzinompatienten vergleichbare epidemiologische, geographische und sozioökonomische Daten vor.

Die Rate der malignen Entartung wird durch villöse und sessile Wuchsform, sowie durch die zunehmende Größe (ca. 98% der Adenome mit invasivem Karzinom sind größer als 1cm)⁶⁹ der Adenome begünstigt⁷⁰.

Des Weiteren können auf molekularpathologischer Ebene vergleichbare Befunde (z.B. chromosomale Deletionen) nachgewiesen werden.

Über die stufenweise molekulare Karzinogenese wurde 1990 wurde von Fearon⁷¹ und Vogelstein⁷² ein Schema postuliert: Nach initialen Mutationen oder LOHs von APC auf Chromosom 5, sollen Punktmutationen in K-ras und Verluste von Tumorsuppressorgenen wie DCC (deleted in colorectal cancer) auf Chromosom 18 q für weiteres Wachstum und Fortschreiten der kolorektalen Neubildung verantwortlich sein⁷³. LOH des p53 Locus soll schließlich eng mit dem Progress eines Adenoms in ein invasives Karzinom verbunden sein⁷⁴.

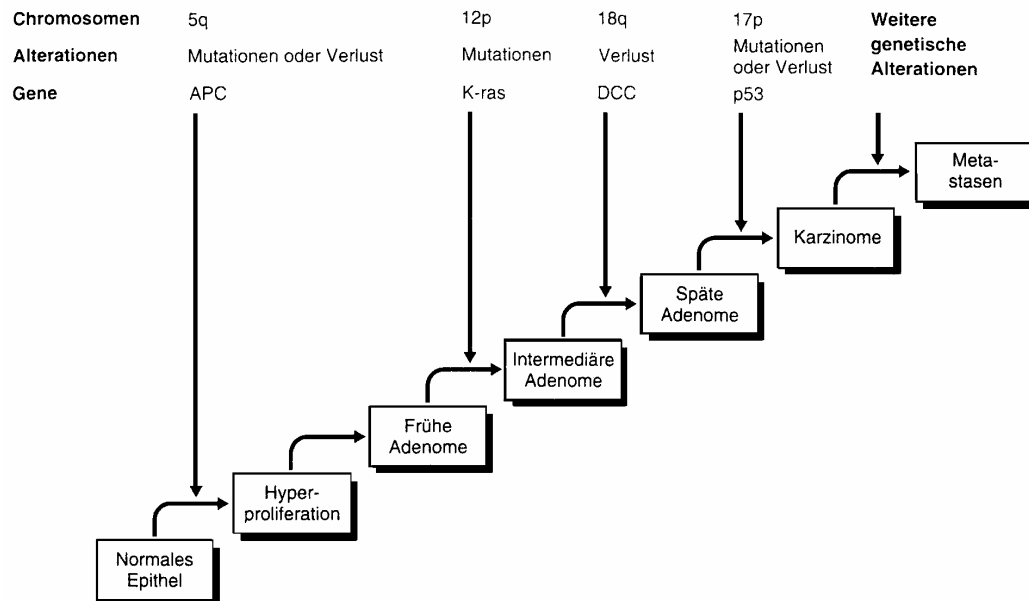


Abbildung 2: Genetische Entwicklung der kolorektalen Karzinome

(nach: Remmele W. (Hrsg.), *Pathologie 2 Verdauungstrakt*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S.647/Abb.7.55)

Molekulargenetische Befunde, wie die K-ras oder p53 Mutation, sind zur Früherkennung und für prognostische Aussagen hinsichtlich des kolorektalen Karzinoms geeignet⁷⁵.

Mikrosatelliteninstabilität (MSI):

Einen Entartungsmechanismus stellt die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar, welche durch Funktionsverluste in DNA-Reparaturgenen verursacht wird. MSI lässt sich durch Längenalterationen in kurzen, sich wiederholenden (1-6bp), oft nicht kodierenden DNA-Sequenzen, den sogenannten Mikrosatelliten (50-300bp), nachweisen⁷⁶. MSI ist hierbei kein zufällig über alle Repeat-Typen gleichmäßig verteiltes Ereignis. Nukleotidsequenzen mit hohem Anteil an Mono- und Dinukleotiden sind bevorzugt betroffen: So treten von den verschiedenen Repeat-Typen (A)_n-Repeats gefolgt von (CA)_n-Repeats⁷⁷ mit ca. 50.000-100.000 Loci am häufigsten auf, wobei *n* zwischen 10 und 60 schwankt⁷⁸.

Der Begriff der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezieht sich dabei auf die veränderte Basenzahl in den repetitiven DNA-Sequenzen im Vergleich von Normal- und Karzinomzellen.

Durch Insertion, Deletion und Basenfehlpaarungen können Schlingenbildungen und Replikationsfehler entstehen, die in einer gesunden Zelle durch Mismatch-Repair-

Proteine (MMRP) korrigiert, in einer reparaturdefizienten neoplastischen Zelle dagegen als Mutation bestehen bleiben⁷⁹.

Die häufigste Ursache einer hochfrequenten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) beim hereditären kolorektalen Karzinom (CRC) und beim Magenkarzinom stellt der Funktionsverlust eines Mismatchrepairgens (häufig hMLH1 oder hMSH2) infolge Keimbahnmutation dar⁷⁷. Den sporadischen MSI-H Karzinomen liegt praktisch immer ein Expressionsverlust des MMRP hMLH1, durch epigenetische Promotor-Methylierung, zugrunde^{80, 81}.

Ein autosomal dominantes Vererbungsmuster zeigen die meisten Krebs syndrome, wie beispielsweise auch das HNPCC-Syndrom. Molekulargenetisch liegen diesem zwei unterschiedliche Mechanismen der Genaktivierung, bzw. -inaktivierung zu Grunde. Meistens treten Mutationen der Tumorsuppressorgenregionen auf, die ihre kanzerogene Potenz dann zeigen, wenn ihre supprimierende Funktion durch Mutation beider Allele oder LOH und Mutation ausgefallen ist.

Findet sich nun eine Keimbahnmutation eines Allels („first hit“), wie dies beim HNPCC-Syndrom (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer-/Lynch-Syndrom) der Fall ist⁸², und geht das zweite Allel im Laufe des Lebens („second hit“) gemäß der Two-Hit-Hypothese nach Knudson^{83, 84} auch noch verloren, so entsteht der Replication Error Phänotyp, und die Betroffenen erkranken bereits in jungen Jahren an Tumoren, wie z.B. an kolorektalen Karzinomen.

Studien belegen, dass Mikrosatelliteninstabilität in fast 90% der Karzinome von Patienten mit HNPCC nachgewiesen werden können⁸⁵. Mikrosatelliteninstabilität ist auch in knapp 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome zu finden⁸⁶, welche über 90% der Kolonkrebserkrankungen ausmachen. Bei sporadischen Tumoren tritt Mikrosatelliteninstabilität erst später auf und ist daher in Adenomen selten (<5%) vorzufinden⁸⁷. (siehe hierzu auch Kap. 1.2.1)

Klinisch-pathologische Relevanz der hochfrequenten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H):

Eine Repeat-Längenveränderung in kodierenden Genregionen führt häufig zu Leserasterverschiebungen (frameshifts) oder zur Entstehung von verkürzten funktionslosen (trunkierten) Proteinen, so dass zelluläre Signalwege dereguliert werden. Unter anderem treten zum Beispiel inaktivierende Mutationen im (A)₈-Repeat des transforming growth factor-Rezeptor II (TGF-RII), welcher eine wachstumsinhibierende

Funktion im Kolorektum innehat, auf⁸⁸. Diese Mutationen bewirken früh im MSI-Karzinogenese-Prozess einen Wachstumsvorteil.

Die Mortalitätsrate von Patienten mit MSI-H Karzinomen ist, unabhängig vom Tumorstadium, signifikant reduziert⁸⁹. Eine – allerdings nicht statistisch signifikante – Tendenz zu längeren Überlebensraten (10-Jahres-follow-up nach kurativer Resektion) von Patienten mit MSI-H kolorektalen Karzinomen im Dukes Stadium B und C wurde auch von Diep CB. et al. erfasst⁹⁰. Elsalem et al. konnten außerdem für Patienten mit MSI-H Karzinomen im Dukes Stadium C (unabhängig ob HNPCC-assoziiert oder sporadisch) einen Überlebensvorteil unter adjuvanter Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU)-Basis nachweisen⁹¹. Eine bessere Ansprechrate auf 5-FU zeigten MSI-H Karzinome (65%) im Vergleich zu MSS-Karzinomen (35%) ebenso in der Arbeitsgruppe von Liang JT. et al.⁹². Im Gegensatz dazu ermittelten Ribic CM. et al. jedoch einen Nutzen einer auf 5-FU basierenden Chemotherapie für Patienten mit MSS- und MSI-L Karzinomen, nicht hingegen für Patienten mit MSI-H Karzinomen im Stadium II oder III⁹³.

Makroskopie und Histologie von MSI-H Karzinomen:

Kolorektale Karzinome mit MSI-H sind häufiger im rechtsseitigen Kolon (proximal der linken Flexur) lokalisiert, sind histopathologisch häufiger muzinös differenziert und haben univariat eine günstigere Prognose⁹⁴. Des Weiteren sind diese Karzinome diploid, weisen immunhistochemisch keine Stabilisierung des p53 auf und zeigen in etwa 10-30% eine solid-medulläre Wachstumsform⁹⁵.

In einer Studie, die bei Magenkarzinomen einen Zusammenhang zwischen Mikrosatellitenalterationen und Differenzierungsgrad herzustellen versucht, fanden Han et al.⁹⁶ Instabilitäten vorwiegend bei wenig differenzierten Karzinomen, die Rate bei hochdifferenzierten Karzinomen war dagegen viermal niedriger. Während die Arbeitsgruppe um Rhyu et al.⁹⁷ keine Korrelation zum Differenzierungsgrad feststellen konnten, wiesen Chong et al.⁹⁸ hingegen eine signifikante Korrelation der Mikrosatelliteninstabilität mit hochdifferenzierten, intestinalen Karzinomen und fortgeschrittenen Tumorstadien nach.

Chromosomale Instabilität (CIN)/Loss of Heterozygosity (LOH):

Die Mikrosatellitenanalyse ermöglicht zugleich den Nachweis von Loss of Heterozygosity (LOH), einer weiteren Variante der genomischen Instabilität. Dabei

kommt es zu einem Verlust eines Chromosomenbestandteils oder eines ganzen Chromosoms, wodurch ein Allel verloren geht („Loss of Heterozygosity“ – LOH). Über 75% der kolorektalen Karzinome zeigen LOHs auf Chromosom 17p und 18q, außerdem – zu geringeren Prozentzahlen – auch auf den Chromosomen 8p und 5q⁹⁹. Diese fehlenden Segmente kodieren Tumorsuppressorgene, deren Funktion es ist, das Zellwachstum zu kontrollieren, und deren Genprodukte beider Allele in Tumoren inaktiviert sind¹⁰⁰. Zum Beispiel durch Inaktivierung des APC-Proteins (Tumorsuppressorgen, wichtige Funktion bei der Zellzykluskontrolle, bei Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose über den Catenin-Signalweg und bei der chromosomalen Segregation¹⁰¹) auf Chromosom 5 q entstehen aneuploide kolorektale Karzinome – dieser Vorgang wird auch als Entwicklungsweg der *chromosomalen Instabilität (CIN)* bezeichnet.

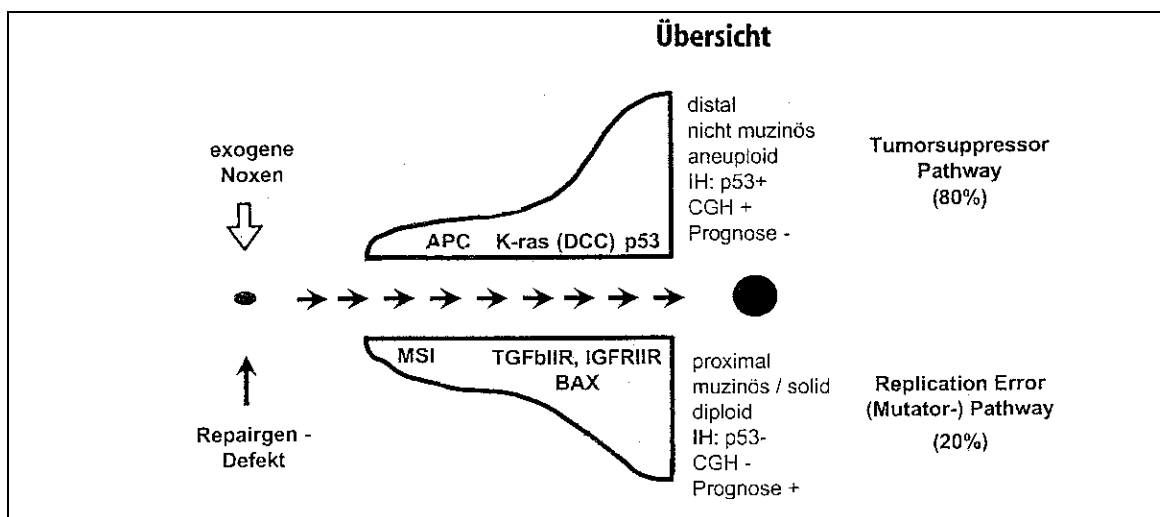


Abbildung 3: Übersicht über Karzinogenesepathways beim CRC (nach Peruchio M.¹⁰²)

MSI-H und MMRP-Expression in der Immunhistochemie (IH):

Aufgrund der hohen Konkordanz von Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) und MMR-Proteinexpressionsverlust wird in der Regel ergänzend zur MSI-Analyse die immunhistologische Untersuchungen von Normal- und Tumorgewebe mit monoklonalen Antikörpern für die am häufigsten betroffenen MMR-Proteine hMLH1, hMSH2 und hMSH6 durchgeführt. Der immunhistochemisch nachgewiesene MMRP-Expressionsverlust im Tumorgewebe kann darauf hinweisen, in welchem der MMR-Gene durch Sequenzierung nach der pathogenen Keimbahnmutation gesucht werden sollte. Dieses Vorgehen rationalisiert die insgesamt aufwendige MMR-Gen-

Sequenzierung, da die MMR Gene sehr groß sind (hMLH1 16 Exons, hMSH2 19 Exons) und keine „hotspots“ für Mutationen aufweisen.

Bei klinisch definierten (Amsterdam-Kriterien) HNPCC-Patienten werden mittels DNA-Sequenzierung 45-70% Keimbahnmutationen nachgewiesen, wovon 50% bei hMLH1, 40% bei hMSH2 und lediglich 10% bei hMSH6 auftreten^{103, 104}.

Der Mutationsnachweise ermöglicht einerseits die gezielte Untersuchung von Familienangehörigen und andererseits die Abgrenzung von ca. 12 % sporadischen MSI-H-Karzinomen, bei welchen epigenetische Modifikationen wie zum Beispiel Promotor-Methylierung Ursache für die MSI-H sind.

CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP):

Spezies- und gewebsspezifische transkriptionelle Genregulation durch DNA-Modifikation, die durch Chromatinstrukturveränderungen infolge Histon-Azetylierung oder durch Cytosin-Methylierung innerhalb von CpG-Dinukleotiden erfolgt, wird als *Epigenetik* bezeichnet. Bei diesen Methylierungsprozessen werden v.a. CpG-reiche DNA-Regionen (CpG-Inseln) in genregulatorischen Abschnitten (Promotorregionen) methyliert und somit die entsprechenden Gene inaktiviert. In Tumorzellen ist damit das epigenetische Gleichgewicht gestört, woraus ein Verlust von Tumorsuppressorgen resultieren kann.

Bei sporadischen instabilen Karzinomen ist die Promotor-Hypermethylierung von hMLH1 von Bedeutung. Diese epigenetische Inaktivierung führt, ebenso wie die genetische Inaktivierung durch Keimbahnmutationen (HNPCC-Patienten), zum Funktionsverlust der Gene mit hoher Mikrosatelliteninstabilität im Karzinomgewebe.

1.5 Fragestellung

Das zweite (klassische als auch revidierte) Bethesda-Kriterium definiert Patienten mit syn- und metachronen HNPCC-assoziierten Karzinomen und klassifiziert diese Patienten als Risikogruppe für das Vorliegen eines HNPCC-Syndroms. Entsprechend wird bei diesen Patienten an Tumor- und Normalgewebe ein HNPCC-Screening, d.h. MSI-Analyse und immunhistochemische Darstellung der MMRP empfohlen, um ggf. HNPCC-Patienten zu erkennen. Die Tumor-Populationen der vorliegenden Arbeit setzen sich ausschließlich aus syn- und metachronen kolorektalen und gastralen Karzinomen zusammen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Karzinome intra- und interindividuell genetisch unterscheiden und zu analysieren, ob sie über denselben Weg der Tumorentstehung (CIN oder MSI) entstanden sind.

Hierzu wurden MSI-Analysen, immunhistochemische Untersuchungen zur MMRP-Expression sowie LOH-Analysen durchgeführt.

II. Material

2.1 Laborgeräte

- Einmalhandschuhe (Safeskin corp. San Diego, California)
- Gelelektrophorese-Spannungsquelle (BIORAD, München)
- Gelelektrophorese-System BIORAD Wide Mini-Sub Cell GT (BIORAD, München)
- Lichtmikroskop HM-Lux 3 (Leitz, Wetzlar)
- Lichtmikroskop Leitz DM IL (Leitz, Wetzlar)
- Mikrowelle Whirlpool Jet 900 W M600 (Philipps, Niederlande)
- Objektträger Super Frost Plus (Menzel-Gläser, Germany)
- Pipetten Pipetman (P-10 bis P-1000) (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- Pipetten Finnpiquette Labsystems
- Pipettenspitzen mit Sterilfilter (BIOZYM, Oldenburg)
- Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5ml (Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5ml (Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße PCR 8-Strip Tubes (Eppendorf, Hamburg)
- Reinigungstücher Kleenex (Kimberley-Clark, Northop, England)
- Schlittenmikrotom HM 400 (MICROM, Heidelberg)
- Sequencer ABI PRISMTM 310 (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, USA)
- Sterile Nadeln Microlance 3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY)
- Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research Gradient (Eppendorf, Hamburg)
- Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research (Watertown, MS, USA)
- Tischvortex Reax 2000 (HEIDOLPH, Kehlheim)
- Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)
- Zentrifuge Biofuge (Heraeus, Osterode)

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen Analysequalität auf.

- Agarose ultra Pure (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- Desoxyribonukleotidtriphosphate (Boehringer, Mannheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (MERCK, Darmstadt)
- DNA-Molekulargewichtstandard λ -DNA/Hind III-Fragmente (Life Technologies)
- Ethanol Rotipuran 99,8% p.a. (Roth, Karlsruhe)

- Ethidiumbromid (MERCK, Darmstadt)
- Formamid (SIGMA, München)
- Gene Scan – 350 (TAMRA) Size Standard (PE Applied Biosystems, Warrington, England)
- Gene Scan – HD 400 ROX Size Standard (PE Applied Biosystems, Warrington, England)
- HNPPC Microsatellite Instability Test (Boehringer, Mannheim)
- $MgCl_2$ (Boehringer, Mannheim)
- Primer (GENSET SA; Paris, Frankreich)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- Taq-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)
- Xylen Cyanol FF (SIGMA, München)
- 10x PCR-Puffer (Roche, Mannheim)
- 10x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$ (Roche, Mannheim)

2.3 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde MILLIPORE-gefiltertes Wasser verwendet.

- Allgemeine Lösung

1M Tris:	Tris	121,1g
	Wasser	800,0ml
	mit konz. HCl gewünschten pH einstellen,	
	auf Raumtemperatur abkühlen lassen	
	Wasser	90,0ml
	aliquotieren, autoklavieren	

- Lösung für die HE-Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5%) (Merck, Darmstadt)	
Monohydratpulver	0,5g
Ethanol	10,0ml
Wasser	90,0ml
> Reifezeit 5 Wochen	

Eosin (0,5%) (Merck, Darmstadt), gebrauchsfertig

- Lösung für die DNA-Isolation aus Paraffinblöcken

70% Ethanol: Ethanol abs. 700,0ml

Wasser 300,0ml

Digestion-Buffer: 10x PCR-Puffer 100µl

Tween 20 (0,5%) 5µl

Wasser 895µl

Proteinase K (Merck, Darmstadt), gebrauchsfertig

- Lösung für die Amplifikation genomischer DNA mittels PCR

Taq-Polymerase (Roche, Mannheim), gebrauchsfertig

dNTP- Mischung (10mM): je 10µl dATP, dGTP, dTTP, dCTP und 60µl Wasser

PEP-Primer (MWG Biotech)

- Lösung für die Agarose Gelelektrophorese

TAE (50x): Tris 242,0g

Eisessig 57,1ml

0,5M EDTA (pH 8,0) 100,0ml

Wasser ad 1000ml

Hind III: Marker 20µl

Stoppuffer 16,7µl

Wasser 63,3µl

Agarosegel (2%): Agarose 2,0g

TAE (1x) ad 100ml

Stoppuffer: 0,5M EDTA (pH 8,0) 60µl

Bromphenolblau 0,0125g

Ficoll (Typ 400) 0,75g

> in 5ml Wasser lösen

Ethidiumbromid-Lösung (0,04%): Ethidiumbromid 125µl

Wasser ad 500ml

<i>Mikrosatellitenmarker</i>	<i>Chromosomale Lokalisation (Gen, nahe dem Marker)</i>	<i>Größe (bp) Amplifikationsprodukt</i>
BAT 25	4q12 (c-kit)	110-130
BAT 26	2p16.3-p21 (hMSH2)	100-120
D5S346 (APC)	5p21/22 (APC)	100-130
D17S250 (Mfd 15CA)	17q11.2-q2 (BRCA1)	140-170
D2S123	2p16 (hMSH2)	200-230

Tabelle 9: Details zu den verwendeten Mikrosatellitenmarkern

BAT25 und BAT26 sind Mononukleotid-, APC, Mfd15 und D2S123 Dinukleotidwiederholungen (CA).

In der Studie von Dietmaier W. et al.¹¹² über die Definition und Korrelation von MSI mit Mismatch-Repair-Protein Expression deckten BAT26 und Mfd15 mit hoher Spezifität MSI-H Karzinome, APC und D2S123 mit hoher Sensitivität sowohl MSI-L als auch MSI-H Karzinome auf. Diese fünf Marker (BAT25, BAT26, APC, Mfd 15 und D2S123) wurden als internationales Referenzpanel definiert und wurden in dieser Arbeit für die MSI-Analyse verwendet.

2.5 Gewebe

Am Institut für Pathologie der Universität Regensburg erfolgten Fixierung und Aufarbeitung der Präparate sowie die Archivierung der Paraffinblöcken, welche zur DNA Gewinnung von Tumor- und Normalgewebe durch manuelle Mikrodisektion benötigt wurden.

2.5.1 Dickdarmkarzinome

Die Gruppe der metachronen Dickdarmkarzinome setzte sich aus zwölf Karzinomen von sechs Patientinnen zusammen, die 32 synchronen Dickdarmkarzinome stammten von fünfzehn Patientinnen.

2.5.1.1 Metachrone Dickdarmkarzinome

<i>Jahr- gang</i>	<i>Alter bei OP</i>	<i>OP- Zeitpunkt</i>	<i>Karzinomlokalisation</i>	<i>Grading, Staging</i>
1929	69	10/1998	Colon transversum	G2, pT4, pN0
	70	11/1999	Sigma	G2, pT3, pN0
1937	62	2/1999	Rektum	G2, pT2 pN0
	62	9/1999	Neosigma	G2, pT3, pN0
1914	79	10/1993	Caecum	G3, pT3, pN1
	84	8/1998	Colon transversum	G2, pT3, pN1
1912	80	6/1992	Colon descendens	G2, pT3, pN3
	83	8/1995	Caecum	G3, pT4, pN3
1940	56	6/1996	rekto-sigmoidaler Übergang	G2, pT3, pN2
	59	4/1999	Colon ascendens	G3, pT1, pN0
1925	71	6/1996	Colon ascendens	G2, pT3, pN0
	75	9/2000	Colon transversum	G2, pT2, pN0

Tabelle 10: Details zu den Patienten mit metachronen Dickdarmkarzinomen

Das Durchschnittsalter bei Operation des Erstkarzinoms betrug 69,5 Jahre (minimal 56 Jahre, maximal 80 Jahre), bei Operation des Zweitkarzinoms 72 Jahre (minimal 59 Jahre, maximal 84 Jahre).

2.5.1.2 Synchroner Dickdarmkarzinome

<i>Jahr- gang</i>	<i>Alter bei OP</i>	<i>OP- Zeitpunkt</i>	<i>Karzinomlokalisation</i>	<i>Grading, Staging</i>
1920	80	2/2000	2x Sigma	G2, pT3, pN2 G1, pT1, pN0
1922	77	5/1999	2x Rektum	G2, pT1, pN0 G2, pT1, pN0
1921	78	10/1999	2x Caecum	G3, pT4, pN0 G3, pT4, pN0
1913	84	6/1997	Colon transversum Colon descendens	G1, pT2, pN1 G2, pT3, pN1
1930	69	6/1999	2x Caecum	G3, pT3, pN1 G3, pT2, pN1
1929	70	7/1999	2x Sigma	G3, pT2, pN2 G3, pT1, pN2
1935	64	9/1999	Caecum Colon ascendens	G2, pT1, pN0 G2, pT3, pN0
1935	63	12/1998	2x Sigma	G2, pT3, pN0 G2, pT1, pN0
1916	82	2/1998	2x Rektum	G3, pT1, pN2 G2, pT3, pN2
1904	92	1/1996	Colon ascendens Colon transversum	G2, pT4, pN1 G2, pT1, pN0
1913	83	8/1996	Colon descendens sigmoidaler Übergang	G3, pT3, pN2 G2, pT3, pN2
1955	41	9/1996	2x Caecum 2x Colon ascendens (bei adenomatöser Polypose)	2x G2, pT3, pN1 2x G3, pT1, pN1
1910	85	7/1995	2x Rektum	G2, pT3, pN1 G3, pT3, pN1
1938	57	2/1995	2x Rektum	G2, pT4, pN1 G3, pT1, pN1

<i>Jahr- gang</i>	<i>Alter bei OP</i>	<i>OP- Zeitpunkt</i>	<i>Karzinomlokalisation</i>	<i>Grading, Staging</i>
1924	72	4/1996	Caecum Sigma	G2, pT3, pN3 G3, pT4, pN3

Tabelle 11: Details zu den Patienten mit synchronen Dickdarmkarzinomen

Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug zum Operationszeitpunkt 73 Jahre (minimal 41 Jahre, maximal 92 Jahre).

2.5.2 Magenkarzinome

Die Magenkarzinome setzten sich aus der Gruppe der synchronen Karzinome von sechs Patientinnen zusammen.

<i>Jahr- gang</i>	<i>Alter bei OP</i>	<i>OP- Zeitpunkt</i>	<i>Karzinomlokalisation</i>	<i>Grading, Staging</i>
1930	69	3/1999	Antrum/Corpus Pylorus	G2, pT1, pN0 G2, pT2, pN0
1920	75	8/1995	Antrum Corpus, kleine Kurvatur	G3, pT2, pN2 G3, pT1, pN2
1955	39	11/1994	kleine Kurvatur große Kurvatur	G3, pT1, pN0 G3, pT1, pN0
1931	65	12/1996	Cardia präpylorisch	G3, pT3, pN2 G2, pT2, pN2
1913	84	12/1997	Corpus Pylorus	G2, pT2, pN0 G2, pT2, pN0
1914	79	12/1993	Corpus Antrum	G3, pT3, pN2 G3, pT3, pN2

Tabelle 12: Details zu den Patienten mit synchronen Magenkarzinomen

Zum Operationszeitpunkt betrug das Durchschnittsalter 68,5 Jahre (minimal 39 Jahre, maximal 84 Jahre).

III. Methoden

Die einzelnen Vorbereitungen und Arbeitsschritte werden im Folgenden erläutert:

3.1 Gewinnung von DNA aus Paraffinblöcken

3.1.1 Herstellung von Schnitten

Die DNA ist ein sehr langes, fadenförmiges Makromolekül aus zahlreichen Desoxyribonukleotiden, welche jeweils aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe bestehen. Träger der genetischen Information sind die Basen, Zucker- und Phosphatgruppe erfüllen strukturelle Aufgaben. Die doppelsträngige DNA besteht aus ungefähr 3×10^9 Basenpaaren und liegt im Zellkern, an basische Histonproteine gebunden, als Chromatin vor. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Dieses besteht aus acht Histonproteinen und die, in 2,5 Windungen (140bp), um das Oktamer laufende DNA-Helix. Zwischen derartigen Mononukleosomen liegende DNA ist an sequenzspezifische DNA-bindende Proteine assoziiert¹⁰⁵.

Um die Erbinformation als wesentliche Grundlage für die molekularbiologische Analyse der Mikrosatelliten-Instabilität zu gewinnen, muss sie zunächst aus ihrer komplexen Verpackung gelöst und von assoziierten Proteinen gereinigt werden.

Die DNA-Isolierung aus formalin-fixiertem Paraffinmaterial (PET) wurde erstmals von Goelz et al. (1985) für die Southern-Blot-Analyse beschrieben¹⁰⁶. Die Eignung der auf dieser Weise gewonnenen DNA für weitere Amplifikation mittels PCR wurde von Greer et al. (1991) beschrieben¹⁰⁷.

Für die MSI-Analyse ergeben sich daraus folgende Vorteile:

- Seit Jahren werden die im pathologischen Institut der Universitätsklinik Regensburg eingesandten Präparate nach dem Zuschnitt für einige Stunden in 4%-iger Formalinlösung fixiert, anschließend in Paraffinblöcke gegossen und archiviert. Dies eröffnet die Möglichkeit eine repräsentative Anzahl an Patienten für die Studie auszuwählen.
- Die DNA-Präparation aus PET ist relativ einfach durchzuführen, und in den meisten Fällen ist die Amplifikation erfolgreich.
- Da bereits geringe DNA-Mengen für die PCR-Amplifikation ausreichen¹⁰⁸, ist eine selektive Auswahl, auch kleiner Karzinomareale, von einem Paraffinschnitt durch Mikrodissektion möglich.

Von den Blöcken wurden jeweils für Mikrodissektion und Immunhistochemie Schnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm und 2 µm angefertigt:

Zuerst wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke auf einer Kühlplatte gekühlt, mit dem Mikrotom in 5 µm dünne Scheiben geschnitten, in ein 35°C warmes Wasserbad überführt und dann auf zuvor beschriftete Glasobjektträger übertragen.

3.1.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Für die folgende Mikrodissektion muss das Material vom Paraffin gereinigt werden. Dazu wurden die trockenen Paraffinschnitte auf einem Ständer 30 min. bei 72°C im Brutschrank inkubiert, wodurch das Paraffin schmolz und ablief. Zum vollständigen Herauslösen des Paraffins wurden die Schnitte für 2-5 min. in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 1-2 min.) überführt.

3.1.3 Manuelle Mikrodissektion der Gewebeschnitte

Mittels manueller Mikrodissektionstechnik ist es möglich unter dem Mikroskop bestimmte Gewebsbezirke zu isolieren¹⁰⁹.

Hierfür wurden die Schnitte mit Methylenblau angefärbt und unter dem Mikroskop das gesuchte Areal eingestellt. Die durch die Blaufärbung sichtbar gemachten Zellareale wurden dann unter mikroskopischer Kontrolle mit einem sterilen Skalpell vom übrigen unerwünschten Gewebe manuell disseziert.

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich Gewebe selektiv gewinnen und Karzinomgewebe von Verunreinigungen durch anderes Gewebe trennen.

Daran anschließend wurde das gewonnene Gewebe in Eppendorf-Cups, welche bereits beschriftet und mit Digestionpuffer gefüllt waren, überführt.

Auf diese Weise wurde sowohl mit dem Karzinomgewebe als auch mit dem Normalgewebe verfahren.

Eine gegenseitige Kontamination der Proben wurde verhindert, indem für jeden Schnitt ein neues, steriles Skalpell verwendet wurde.

3.1.4 Reinigung genomischer DNA durch Proteinase-K-Verdau

Vor Analyse der Nukleinsäuren durch die PCR (Polymerase Ketten Reaktion) muss diese zunächst aus dem Gewebe isoliert werden.

Hierfür wurde als nächstes den Cups, welche das mikrodisezierte Gewebe und 27 µl des Digestionpuffer (1x Expand-PCR-buffer ohne MgCl₂ und 0,5% Tween20) enthielten, jeweils 3 µl Proteinase-K zugegeben. Diese wurde bei –20°C gelagert und musste erst aufgetaut werden.

Die Lyse des mikrodisezierten und abgekratzten Gewebes erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 55°C in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Daran anschließend wurde das Verdauungsenzym durch 15-minütiges Erhitzen auf 94°C inaktiviert.

Die Proben wurden entweder direkt im Anschluss an den Proteinase-K-Verdau amplifiziert oder bei 4-8°C im Kühlschrank bis zur PCR-Amplifikation aufbewahrt.

3.2 Amplifikation genomischer DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

1986 entwickelte Kary Mullis eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen, die man als Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) bezeichnet¹¹⁰.

Durch aufeinanderfolgende DNA-Synthesen kann ein bestimmter DNA-Abschnitt (z.B. ein Mikrosatellitenloкус) von bis zu 1kb Länge in vitro amplifiziert werden. Jeder Amplifikationszyklus besteht aus drei zeitlich aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten:

1. Schritt: Denaturierung:

Durch kurze Hitzeinwirkung (1 min. bei 94°C) wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt (template) in Einzelstrang-DNA überführt.

2. Schritt: Hybridisierung der Primer (annealing):

Nachfolgende Kühlung der DNA auf 55-70°C (je nach Primer) für 1 min. führt zu einem spezifischen Anheften (Hybridisieren) der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide.

3. Schritt: DNA-Synthese durch Elongation:

Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, die optimale Temperatur für die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, ein Enzym des thermophilen Bakteriums *Thermus*

aquaticus. Das Enzym nutzt den Primer als Startpunkt und ergänzt die komplementären Basen des Sequenzabschnittes in 5'-3' Richtung.

Für eine effektive Amplifikation werden 30-40 dieser Amplifikationszyklen benötigt. Wobei bei jedem Zyklus die bereits vorhandene DNA als Matrize für die semikonservative Synthese des neuen Stranges dient. Sodurch verdoppelt sich die DNA bei jedem Zyklus und wächst somit exponentiell.

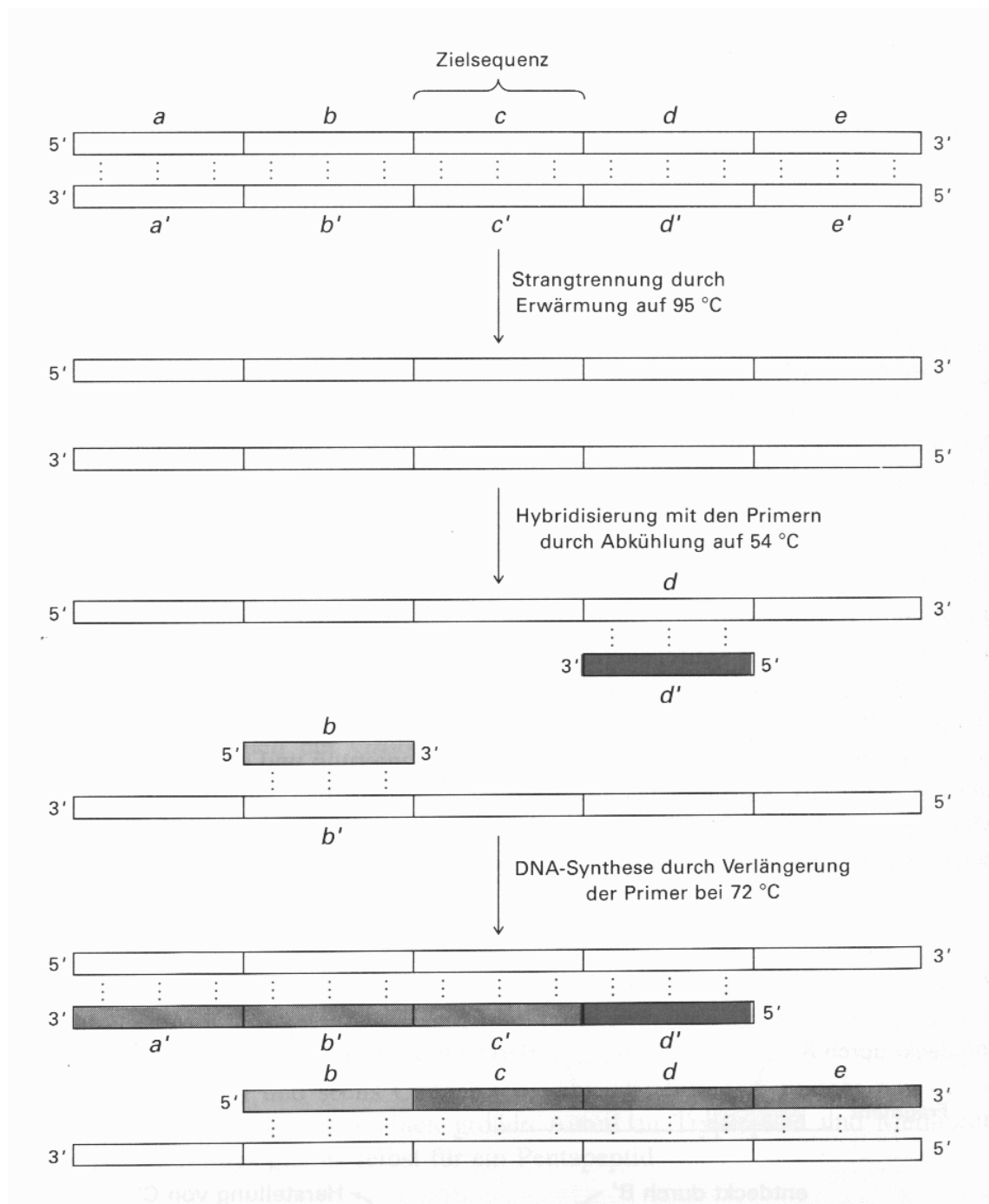


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der PCR

(Stryer L.: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, Oxford, 1996⁴, Abb. 6.23, S. 138)

Die Bindungsspezifität der Primer wird durch ihre Länge stark beeinflusst. Zu kurze Primer sind zu einer Vielzahl von Sequenzen komplementär, so dass die Spezifität der Hybridisierung stark abnimmt. Zu lange Primer hingegen verlängern die Hybridisierungszeit und behindern die Mobilität¹¹¹.

3.2.2 Durchführung der DNA-Amplifikation

Die PCR wurde eingesetzt um von der isolierten DNA ausreichende Mengen für die Untersuchung auf Mikrosatellitenalteration zur Verfügung zu haben.

Hierzu wurden elf Primer ausgewählt, welche auf dem Chromosom 5 liegen. Dieses Chromosom zeigt bereits sehr früh Alterationen (z.B. APC-Gen).

Des Weiteren wurde ein MSI-Panel mit fünf Primern (BAT25, BAT26, D5S346 (APC), D17S250 (Mfd15CA) und D2S123) bearbeitet. Dieses Panel wurde in einer Studie von Dietmaier, W. et al.¹¹² zusammengestellt, mit dem Ziel, die relevantesten Mikrosatelliten-Loci, welche den MSI-Status eines kolorektalen Karzinoms definieren können, zu identifizieren. Zudem wird es von der „American Joint Commission on Cancer“, der Internationalen Arbeitsgruppe an HNPCC, und der „HNPCC Cancer Study Group“ in Deutschland als Referenz-Panel bezeichnet und soll für weitere HNPCC-Studien herangezogen werden.

3.2.3 PEP-PCR

Die PEP-PCR (Primer Extension Preamplification) ermöglicht eine Amplifikation der gesamten genomischen DNA mittels PCR-Technik.

Bei diesem Verfahren finden total degenerierte Primer Verwendung, welche sich aus Oligonukleotiden mit einer Länge von 15 randomisierten Basen zusammensetzen. Diese binden durch den kontinuierlichen Anstieg der Annealingtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/min relativ unspezifisch an das gesamte Genom und führen so zu einer repräsentativen Vervielfältigung aller Chromosomenabschnitte^{113, 114}. Die Elongation findet während der ersten 20 Zyklen bei 55°C, während der anschließenden 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 60°C und einer Elongationstemperatur von 72°C statt. Der zweite Teil soll eine spezifischere Amplifikation begünstigen.

Ein Nachteil der PEP-PCR ist der Verlust des Methylierungs-Musters der nativen DNA, da die entsprechenden Enzyme des Zellkerns fehlen.

Die Proben wurden nach Inaktivierung der Proteinase-K kurz abzentrifugiert und dann die Ansätze für die PEP-PCR auf Eis in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 13: Master-Mix: PEPmod 2:

	μl	Endkonz.	Stammlösung
Primer: PEP	4,8	16 μM	200 μM
MgCl ₂	6,0	2,5 mM	25 mM
DMSO	3,0	5 %	100 %
10x PCR-Puffer	6,0	1 x	10 x
dNTPs	0,6	0,1 mM	10 mM
Taq	1,4	5 U	3,5 U
H ₂ O	28,2		
total	50		

add **50 μl** Master-Mix to **10 μl** template DNA

Nachdem sämtliche Reagenzien in den Master-Mix pipettiert wurden, wurde 10 μl Template-DNA aus dem vorangegangenen Verdau zugegeben, gevortext, zentrifugiert und anschließend die Cups in den, bereits auf die Starttemperatur von 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Dann wurde das folgende Programm gestartet:

<u>PEPmod 2</u>			
94°C	4 min	94°C	30 sec
1°/sec	94°C	1°/sec	94°C
94°C	30 sec	60°C	45 sec
1°/sec	28°C	1°/sec	72°C
28°	1 min	72°C	1 min
0,1°/sec	55°C	go to step 9	29 times
55°C	45 sec	1°C/sec	72°C
go to step 2	19 times	72°C	8 min
1°/sec	94°C	4°C	forever

Tabelle 14: Programm Thermocycler

Daran anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.4 MSI-Panel

Das verwendete MSI-Panel¹¹² wird von der „American Joint Commission on Cancer“, der Internationalen Arbeitsgruppe an HNPCC, und der „HNPCC Cancer Study Group“ in Deutschland als Referenz-Panel bezeichnet und setzt sich folgender Weise zusammen:

<i>Mikrosatellitenmarker</i>	<i>Chromosomale Lokalisation (Gen, nahe dem Marker)</i>	<i>Größe (bp)</i>
BAT 25	4q12 (c-kit)	110-130
BAT 26	2p16.3-p21 (MSH2)	100-120
D5S346 (APC)	5p21/22 (APC)	100-130
D17S250 (Mfd 15CA)	17q11.2-q2 (BRCA1)	140-170
D2S123	2p16 (hMSH2)	200-230

Tabelle 15: Details MSI-Panel

Ausgangs-DNA für den folgenden Ansatz war die zuvor mittels der PEP amplifizierte DNA. Von dieser wurden 3 µl je Cup zugegeben, so dass sich abschließend 25 µl in jedem Reaktionsgefäß befanden.

Der Master-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

PCR-Reaktion, 25 µl Ansatz, 1 Reaktion:

Enzym Master Mix in µl	5
Multi Primer in µl	5
H ₂ O in µl	12
MM	<u>22</u>

Die fertig pipettierten Proben durchliefen dann ein Standard-PCR-Programm mit einer Annealingtemperatur von 55°C über 40 Zyklen. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.5 Vorbereitung für das ABI PRISM™

Zur Auswertung des MSI-Panels wurde 1 µl des PCR-Produktes zu folgendem Mastermix hinzugegeben:

ABI-Mastermix, 1 Reaktion:

Formamid in μl	12
Standard GS 350 TAMRA in μl	0,5
μl pro Cup	12,5

Die auf diese Weise vorbereiteten Cups wurden 2 min. auf 90°C erhitzt und dann auf Eis gelagert, bis sie auf das ABI überführt wurden.

3.2.6 Ansätze weiterer Primer

Die unter Kapitel 2.4 aufgeführten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Eignung zur MSI-Analyse getestet. Da diese Primer am Institut noch nicht etabliert waren, mussten zuerst die optimalen Annealing-Temperaturen ermittelt werden. Dieser Arbeitsschritt erfolgte mit Hilfe der Gradienten-PCR nach folgendem Pipettierschema:

Tabelle 16: Pipettierschema:

55°C, +/- 10, 35x	<i>Master-Mix für 12 Reaktionen</i>			
	μl	Endkonz.	Stammlösung	
H ₂ O	258,4			
DMSO	18,0	5 %	100	%
MgCl ₂	21,6	1,5 mM	25	mM
10x Buffer	36,0	1 x	10	x
dNTPs	7,2	0,2 mM	10	mM
Primer	5,4	0,3 μM	20	μM
Taq-Pol.	1,4	0,02 U/ μl	5	U/ μl
total	348,0			
add 29μl Master-Mix to 1μl template DNA				

In die 11 Cups (0,5 ml-Eppendorf) wurde jeweils die gleiche Template-DNA gegeben, Cup 12 enthielt als Negativkontrolle Wasser.

Das Gradienten-PCR-Programm läuft wie ein Standard-PCR-Programm ab, jedoch wird am Gradientencycler für die Annealingtemperatur ein Bereich vorgegeben, so dass ein Gradient hinsichtlich der Hybridisierungstemperatur entsteht.

Die optimale Temperatur wurde dann durch die Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Bei optimaler Temperatur sind keine uncharakteristischen Banden mehr vorhanden, die spezifische Bande des Primers ist aber gut sichtbar.

Das Gel wurde auf folgende Weise hergestellt:

In einem Erlenmeyerkolben wurden 2 g Agarose mit TAE 1x auf 100 ml aufgefüllt, und in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Nachdem diese etwas abgekühlt war, wurde sie in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Anschließend wurden zwei Kämme mit jeweils 24 Slots eingesetzt. Nachdem das lineare Agarose-Polymer beim Aushärten eine feste Matrix gebildet hat (ca. 30 min.), wurden die Kämme entfernt, das Gel horizontal in eine mit 1x TAE gefüllte Gelkammer überführt und in die entstandenen Slots die Proben aufgetragen. Die Proben, 5 µl PCR-Produkt, wurden zuvor mit 2 µl Xylen Cyanol (Stopppuffer) versehen, so dass sich die DNA beim Auftragen auf das Gel am Boden der Slots absetzte. Zu Beginn jeder Reihe wurde als Größenstandard Hind III-Marker aufgetragen. Nun folgte eine Laufzeit von 30 min. bei 110V. Daran anschließend wurde das Gel 5 min. in 0,04%-Ethidiumbromidlösung gefärbt und für mindestens weitere 5 min. in ein Wasserbad übertragen. Jetzt konnte die DNA in Form weißer Banden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Belichtungszeit von 1-2 Sekunden fotografiert werden.

Mit der als jeweiliger Optimaltemperatur ermittelten Temperatur konnten nun die PCR-Reaktionen der bearbeiteten Primer, nach dem nachfolgendem Schema pipettiert, ablaufen:

Tabelle 17: PCR-Pipettierschema:

40x	<i>Master-Mix für 1 Reaktion</i>			
	<i>µl</i>	<i>Endkonz.</i>	<i>Stammlösung</i>	
H ₂ O	19,6			
DMSO	1,5	5 %	100	%
MgCl ₂	1,8	1,5 mM	25	mM
10 x Buffer	3,0	1 x	10	x
dNTPs	0,6	0,2 mM	10	mM
Primer	0,4	0,3 µM	25	µM
Taq-Pol.	0,1	0,02 U/µl	5	U/µl
Total	27,0			
	add 27µl	Master-Mix to	3µl	template DNA

Bei Primer H wurde die MgCl₂-Konzentration auf 4 mM erhöht.

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Primer-Name (Locus)</i>	<i>Ermittelte Temperatur (°C)</i>
A	D5S1491 5q12.1-12.3	52
B	D5S1464 5q13.1-q13.2	58
C	D5S1472 5q13.3-q14.1	54
D	D5S1467 5q14.1-14.3	58
E	D5S1459 5q13.3	59
F	D5S1404 5q12.3-13.1	52
G	D5S806 5q13.2	55
H	D5S586 5q11.2-12.1	59
I	D5S209 5q13.1-33.3	56
J	D5S1720 5q21.3-q22.1	55
K	D5S82 5q14-q21	50

Tabelle 18: Ermittelte Optimaltemperaturen der Primer des Chromosom 5

Die gewonnen Produkte wurden im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung auf dem ABI zwischengelagert. Die Vorbereitung für das ABI erfolgte in gleicher Weise wie jene für das MSI-Panel lediglich mit dem Unterschied, dass nun der HD 400 ROX-Standard an Stelle des TAMRA-Standards verwendet wurde.

ABI-Mastermix, 1Reaktion:

Formamid in µl	12
Standard HD 400 ROX in µl	0,5
µl pro Cup	<u>12,5</u>

Zu diesen 12,5 µl wurden die zuvor nach folgendem Schema gepoolten PCR-Proben hinzugefügt:

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Primer-Name (Locus)</i>	<i>Markierung</i>	<i>Größe (bp)</i>	<i>Pool-Variation</i>	<i>µl der Ausgangsprobe</i>	<i>µl für ABI</i>
E	D5S1459	HEX	90-110	4er	5µl PCR	20µl daraus 4µl für ABI
G	D5S806	HEX	-195	4er	5µl PCR	
C	D5S1472	6-FAM	-135	4er	5µl PCR	
I	D5S209	6-FAM	195-215	4er	5µl PCR	
D	D5S1467	HEX	-157	3er	5µl PCR	15µl daraus 3µl für ABI
F	D5S1404	HEX	-230	3er	5µl PCR	
A	D5S1491	6-FAM	-210	3er	5µl PCR	
H	D5S586	HEX	-116	4er	5µl PCR	20µl daraus 4µl für ABI
K	D5S82	HEX	169-179	4er	5µl PCR	
B	D5S1464	HEX	-254	4er	5µl PCR	
J	D5S1720	6-FAM	-224	4er	5µl PCR	

Tabelle 19: Schema zum Poolen der PCR-Proben für die Analyse am ABI PRISM™

Die auf diese Weise vorbereiteten Cups wurden 2 min. auf 90°C erhitzt und dann auf Eis gelagert, bis sie auf das ABI überführt wurden.

3.2.7 ABI PRISM™

Der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer nutzt das Prinzip der Kapillarelektrophorese. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Primer in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die gewonnen PCR-Produkte werden dann elektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines Lasers quantitativ vermessen:

Hierbei wird für jede Probe ein gebrauchsfertiges Polymer über eine Kapillare durch das Gerät angesaugt. Des Weiteren werden noch destilliertes Wasser und Analyzer Buffer (1x) benötigt. Die für das ABI vorbereiteten Cups wurden in einem speziellen Ständer in das Sequenziergerät überführt.

Nach Beendigung des Sequenziervorganges wurden die Rohdaten auf einem Macintosh-Rechner unter Verwendung der Software von ABI-PRISM (Version 3.0) ausgewertet

und die Ergebnisse ausgedruckt, wobei jede Probe mit der Patientencodierung und Art der Probe und des Gewebetyps beschriftet war.

Durch Vergleich der PCR-Produkte aus dem Normal- und Tumorgewebe konnte eine Aussage über eine Instabilität des Karzinoms getroffen werden.

3.3 Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen der Reaktionsansätze

Die PCR ist sehr sensitiv und in der Lage, kleinste Mengen an DNA zu amplifizieren¹¹⁵, so dass Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssen, um eine Kontamination zu vermeiden.¹¹⁶ Dies war besonders wichtig, da geringe DNA-Konzentrationen (Mikrodissektion) in die PCR eingesetzt wurden.

Folgende Aspekte waren besonders zu beachten:

1. Das Arbeiten mit der PCR erfolgte an einem Arbeitsplatz, der räumlich von der DNA-Isolierung und sonstigen Tätigkeiten mit Kontaminationsrisiko getrennt war.
2. Alle Laborgeräte wie Pipetten, Pipettenspitzen, Handschuhe und Reaktionsgefäße wurden nur an diesem Arbeitsplatz verwendet.
3. Es wurden Einmalhandschuhe getragen.
4. Alle Reaktionsansätze wurden mit sterilen, gestopften Pipettenspitzen pipettiert.
5. Alle Cups wurden mit Pinzetten der Verpackung entnommen, der Rand der Cups wurde nicht berührt, und sie wurden gleich nach dem Pipettieren wieder verschlossen.
6. Reaktionsgefäße mit PCR-Reagenzien wurden vor dem Öffnen zentrifugiert, um Aerosolbildung beim Öffnen der Cups zu vermindern.
7. Durch Mitführung einer Negativkontrolle, die zuletzt pipettiert wurde, und neben dem Master-Mix nur Wasser enthielt, konnten Kontaminationen erkannt werden. War die Negativkontrolle positiv, das heißt, enthielt sie ein Amplifikat, wurden alle Produkte dieses PCR-Sampels verworfen.

3.4 Fehlerquellen bei ausbleibender Amplifikation

1. Greer et al. zeigten, dass der Amplifikationserfolg vom Grad der Degradation und damit von Fixationsmittel und -zeit, Alter des Paraffinblockes und Länge des zu amplifizierenden DNA-Segmentes abhängig ist. Des Weiteren zeigten Greer et al., dass mit zunehmendem Alter die Größe des amplifizierten DNA-Segmentes abnimmt.
2. Auch beeinträchtigt eine lange Lagerungszeit mit häufig wechselnden Temperaturen (beim Herausnehmen aus dem Kühlschrank) die Erfolgsrate.
3. Eine unvollständige Hitzeinaktivierung der Proteinase-K führt durch anschließenden Verdau der Taq-Polymerase zu deren Aktivitätsverlust. Dies lässt sich durch genaues Einhalten der Inaktivierungszeiten verhindern.
4. Eine unspezifische Amplifikation während des Aufheizens wurde verhindert, indem die Proben erst in die Thermocycler eingesetzt wurden, nachdem die Starttemperatur erreicht war.

IV. Ergebnisse

4.1 Identifikation von Mikrosatelliten Instabilität (MSI)

In dieser Arbeit wurden syn- und metachrone Dickdarm- und synchrone Magenkarzinome von 27 Patientinnen untersucht:

Die Gruppe der metachronen Dickdarmkarzinome setzte sich aus den Karzinomen von sechs Patientinnen zusammen, die synchronen Dickdarmkarzinome wurden von fünfzehn Patientinnen entnommen. Die Magenkarzinome setzen sich aus synchronen Karzinomen von sechs Patientinnen zusammen.

Aus Normal- und Tumorgewebe dieser Patientinnen wurde für die Mikrosatellitenanalyse genomische DNA isoliert, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und mittels ABI ausgewertet.

Die Verteilung der Primer des HNPCC Mikrosatellite Instability Tests ist in folgender Abbildung ersichtlich:

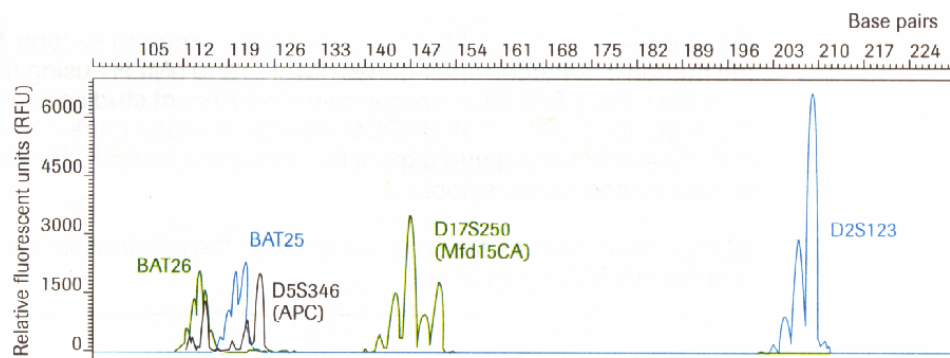


Abbildung 6: Fragmentmuster amplifizierter PCR-Produkte, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (*HNPCC Mikrosatellite Instability Test, Instruction Manual, Version 1, 1998, Fig.1, S.5*)

Das Fragmentmuster eines stabilen Mikrosatelliten Locus zeigt identische Peaks der Fluoreszenzprofile bei Vergleich von Normal- und Karzinomgewebe.

- Sind alle fünf Mikrosatelliten Loci stabil, wird das Karzinom als *Mikrosatelliten stabil (MSS)* klassifiziert^{112, 117}.

Das Fragmentmuster eines instabilen Locus zeigt entweder zusätzliche Peaks oder getrennte, neue Fragmente, wenn Fluoreszenzprofile von Normal- und Karzinomgewebe verglichen werden:

- Ist nur ein Mikrosatelliten Locus instabil (20%), wird das Karzinom als niedrig instabil, *low MSI tumour (MSI-L)*, eingeordnet^{112, 117}.

- Sind mehr als ein Mikrosatelliten Locus (mind. 40%) instabil, wird das Karzinom den hoch instabilen Karzinomen zugeordnet: *high MSI tumour (MSI-H)*^{112, 117}.

4.1.1 Mikrosatellitenanalyse unter Verwendung des Referenzpanels

Bei der MSI-Analyse der Karzinome konnten folgende Mikrosatelliteninstabilitäten ermittelt werden:

- MSS:
 - Metachrone Dickdarmkarzinome: 75% (9 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 81% (26 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 67% (8 von 12 Cas)
- MSI-L:
 - Metachrone Dickdarmkarzinome: 0% (0 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 6% (2 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 0% (0 von 12 Cas)
- MSI-H:
 - Metachrone Dickdarmkarzinome: 25% (3 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 13% (4 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 33% (4 von 12 Cas)

	Metachrone Dickdarmkarzinome		Synchronne Dickdarmkarzinome		Synchronne Magenkarzinome	
Σ Pat.	6		15		6	
Σ Ca	12		32		12	
MSS	Σ Pat.:	4	Σ Pat.:	12	Σ Pat.:	3
	Ca/ Σ Ca:	9/12	Ca/ Σ Ca:	26/32	Ca/ Σ Ca:	8/12
MSI	Σ Pat.:	2	Σ Pat.:	3	Σ Pat.:	3
	Ca/ Σ Ca:	3/12	Ca/ Σ Ca:	6/32	Ca/ Σ Ca:	4/12

Tabelle 20: Ergebnisse der MSI-Analyse in den drei Subpopulationen: Mikrosatelliten stabile (MSS) Karzinome, Mikrosatelliten instabile (MSI) Karzinome;
(Σ Ca = Summe der Karzinome der jeweiligen Subpopulation; Σ Pat. = Summe der Patienten der jeweiligen Gruppe)

Die vorangegangene Tabelle zeigt die Verteilung der Patientinnen und deren Karzinome auf die metachronen und synchronen Dickdarmkarzinome sowie auf die Magenkarzinome und stellt den Unterschied zwischen Mikrosatelliten stabilen Karzinomen und Mikrosatelliten instabilen Karzinomen (jeweils als Anzahl (Ca) im Vergleich zur Gesamtzahl der Karzinome (Σ Ca) in der jeweiligen Gruppe) dar.

(n) Locus mit MSI/Ca	Metachrone Dickdarmkarzinome					Synchrone Dickdarmkarzinome					Synchrone Magenkarzinome				
1						■									
										■					
2							■		■			■	■		
							■		■						
							■		■						
							■		■						
3	■	■	■								■	■	■		
4	■	■	■		■							■	■	■	■
	■	■	■		■										
5											■	■	■	■	■
Locus	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

Tabelle 21: Anzahl (n) und Verteilung der instabilen Mikrosatelliten Loci der zwei MSI-L und elf MSI-H Karzinome in den drei Subpopulationen. (■ = MSI)
Mononukleotide: BAT25, BAT26; Dinukleotide: APC, D17S250, D2S123

Obige Tabelle stellt einen Vergleich der Häufigkeit der von Mikrosatelliteninstabilität betroffenen Loci innerhalb eines Karzinoms bezogen auf die einzelnen Primer des Referenzpanels bei den betroffenen drei metachronen und sechs synchronen Mikrosatelliten instabilen Kolonkarzinome sowie bei den vier synchronen Mikrosatelliten instabilen Magenkarzinome dar.

Patientenunabhängige Zusammenfassung des MSI-Status:

Drei von zwölf (25%) *metachronen Karzinome* waren mikrosatelliteninstabil, wobei keine niedrig, das heißt alle 25% hoch instabil (MSI-H) waren. Die aufgetretenen Instabilitäten zeigten sich bei allen drei Karzinomen in den Markern BAT25, BAT26 und APC und in zwei Karzinomen zusätzlich in D2S123. Alle metachronen Kolonkarzinome waren, im Gegensatz zu den synchronen Kolonkarzinomen, in D17S250 Mikrosatelliten stabil.

Bei den *synchronen Kolonkarzinomen* traten nur in 19% (drei Patientinnen) Instabilitäten auf, die sich jeweils zu 6% (2/32 Cas) auf low-MSI und zu 13% (4/32 Cas) auf high-MSI Karzinome aufteilten. Hierbei zeigten im Vergleich mit den

synchronen Kolonkarzinomen je viermal die Primer BAT26 und D17S250 Mikrosatelliten Instabilitäten. Das eine MSI-L Karzinom wies eine MSI im Marker BAT25 auf, das zweite MSI-L Karzinom im Marker D2S123. Alle vier MSI-H Karzinome zeigten MSI im Primer BAT26 und D17S250 und waren – im Gegensatz zu den metachronen Kolonkarzinomen – im APC-Marker MSS.

33% (4/12) der *synchronen Magenkarzinome* waren MSI-H, wobei alle vier Karzinome MSI in BAT26 und APC aufwiesen. Drei Karzinome zeigten zusätzlich MSI in BAT25 und/oder D17S250 und/oder D2S123 (vgl. Tab. 20 und 21).

MSI-Status patientenbezogen:

Beim Karzinomvergleich innerhalb jeweils einer Patientin mit *metachronen Kolondoppelkarzinomen*, gab es nur bei einer der sechs Patientinnen dieser Gruppe Mikrosatelliten Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden Karzinomen: Das Erstkarzinom war im Gegensatz zum Zweitkarzinom (MSS) im Referenzpanel Mikrosatelliten instabil (MSI-H): MSI traten in BAT25, BAT 26, APC und D2S123 auf. (siehe hierzu auch Kap. 4.5.1)

Im Vergleich der einzelnen *synchronen Kolondoppelkarzinome* der Patientinnen, unterschieden sich bei zwei der 15 Patientinnen Erstkarzinom (MSS) und Zweitkarzinom (MSI-L) um jeweils eine Mikrosatelliteninstabilität (einmal in D2S123 und einmal in BAT25 und somit in zwei Primern, welche insgesamt nur jeweils einmal innerhalb dieser Gruppe instabil nachgewiesen wurden). (vgl. auch Kap. 4.5.2)

Bei zwei der sechs Patientinnen mit *synchronen Magenkarzinomen* waren Erst- und Zweitkarzinom im MSI-Status verschieden: Jeweils ein Karzinom war MSI-H (Instabilitäten in BAT26, APC, D17S250 und D2S123, bzw. zusätzlich noch in BAT25), das andere Karzinom war MSS. (siehe hierzu Kap. 4.5.3)

4.1.2 Mikrosatellitenanalyse unter ausschließlicher Verwendung von elf Mikrosatelliten Markern auf Chromosom 5

Auch auf Chromosom 5 klassifizierten wir die Karzinome als MSS, MSI-L und MSI-H wie folgt:

- Waren alle elf Mikrosatelliten Loci stabil, wurde das Karzinom als Mikrosatelliten stabil (MSS) eingeordnet.
- Waren nur ein oder zwei Loci instabil, wurde das Karzinom als niedrig instabiles Karzinom (MSI-L) klassifiziert.
- Waren drei oder mehr als drei Mikrosatelliten Loci instabil, wurde das Karzinom den hoch instabilen Karzinomen (MSI-H) zugeordnet.

Bei der MSI-Analyse mit auf Chromosom 5 lokalisierten Markern wurden folgende Mikrosatelliteninstabilitäten ermittelt:

- MSS: - Metachrone Dickdarmkarzinome: 17% (2 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 72% (23 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 58% (7 von 12 Cas)
- MSI-L: - Metachrone Dickdarmkarzinome: 50% (6 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 28% (9 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 17% (2 von 12 Cas)
- MSI-H: - Metachrone Dickdarmkarzinome: 33% (4 von 12 Cas)
 - Synchronne Dickdarmkarzinome: 0% (0 von 32 Cas)
 - Synchronne Magenkarzinome: 25% (3 von 12 Cas)

Außer des Referenzpanels¹¹² wurden noch *elf weitere Primer (Chromosom 5)* untersucht:

	Metachrone Dickdarmkarzinome							Synchrone Dickdarmkarzinome			Synchrone Magenkarzinome							
Σ Pat.	6							15			6							
Σ Ca	12							32			12							
MSS	Σ Pat.:		1					Σ Pat.:		8	Σ Pat.:		2					
	Ca/ΣCa:		2/12					Ca/ΣCa:		23/32	Ca/ΣCa:		7/12					
MSI	Σ Pat.:		5					Σ Pat.:		7	Σ Pat.:		4					
	Ca/ΣCa:		10/12					Ca/ΣCa:		9/32	Ca/ΣCa:		5/12					
(n) Ca	2	5	1	1	1	1	1	23	6	3	7	1	1	1	0	1	0	1
(n) instabile Loci	0Primer	1Primer	2Primer	3Primer	4Primer	5Primer	6Primer	0Primer	1Primer	2Primer	0Primer	1Primer	2Primer	3Primer	4Primer	5Primer	6Primer	7Primer
	MSS	MSI-L		MSI-H				MSS	MSI-L		MSS	MSI-L		MSI-H				

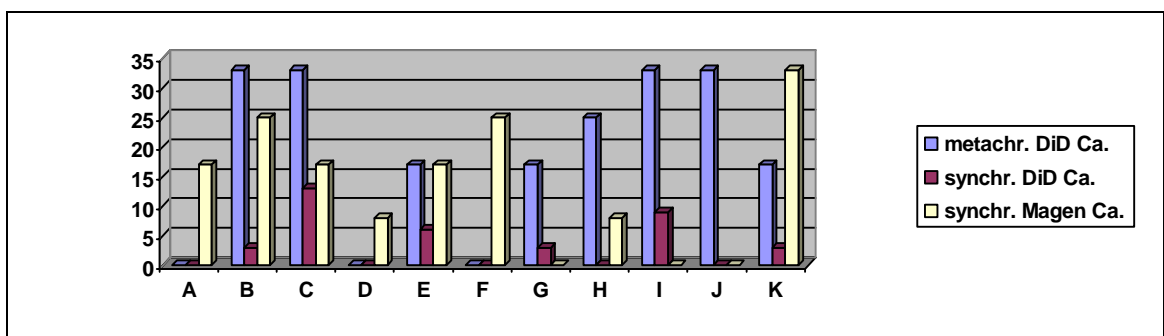
Tabelle 22: Anzahl (n) der Loci auf Chromosom 5 mit MSI und MSI-Status in den drei Subpopulationen.

(Mikrosatelliten stabile (MSS) Karzinome, niedrig- (MSI-L) und hochinstabile (MSI-H) Karzinome; Σ Ca = Summe der Karzinome der jeweiligen Subpopulation; Σ Pat. = Summe der Patienten der jeweiligen Gruppe)

Die Instabilitäten der Mikrosatellitenmarker verteilten sich in ihrer Gesamtzahl wie folgt auf die untersuchten Primer/Loci des Chromosoms 5:

Locus (Chr. 5)	(n) Metachrone Dickdarmkarzinome	(n) Synchrone Dickdarmkarzinome	(n) Synchrone Magenkarzinome
A (D5S1491) 5q12.1-12.3	0	0	2
B (D5S1464) 5q13.1-13.2	4	1	3
C (D5S1472) 5q13.3-14.1	4	4	2
D (D5S1467) 5q14.1-14.3	0	0	1
E (D5S1459) 5q13.3	2	2	2
F (D5S1404) 5q12.3-13.1	0	0	3
G (D5S806) 5q13.2	2	1	0
H (D5S586) 5q11.2-12.1	3	0	1
I (D5S209) 5q13.1-33.3	4	3	0
J (D5S1720) 5q21.3-q22.1	4	0	0
K (D5S82) 5q14-q21	2	1	4

Tabelle 23: Häufigkeit und Verteilung der Mikrosatelliten-Loci mit MSI in den drei Subpopulationen. Häufig betroffene Loci in jeder Subpopulation sind in der Tabelle fett gedruckt hervorgehoben.



Säulendiagramm 1: Häufigkeit von MSI (in %) in den elf untersuchten Loci (A-K) des Chromosom 5 in den drei Subpopulationen

(metachr. DiD Ca. = metachrone Dickdarmkarzinome, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome, synchr. Magen Ca = synchrone Magenkarzinome)

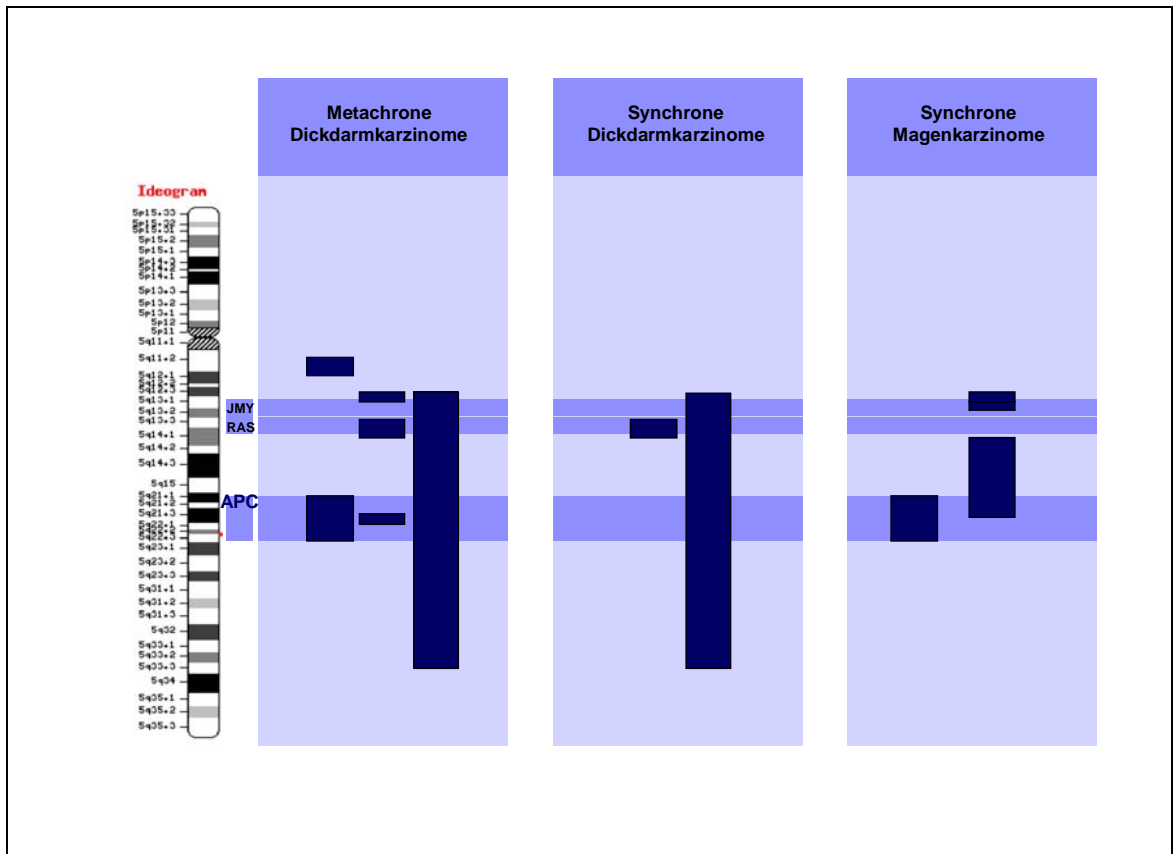


Abbildung 7: Verteilung der häufig instabilen Loci (dunkelblaue Bereiche) des Chromosom 5 und des Referenzpanels (APC-Primer) in den drei Subpopulationen im graphischen Vergleich im Bezug zu Chromosom 5 und den Loci APC, RASq21 und JMY (Co-Faktor für p53) (hellblau hinterlegte Bereiche).

Bei der Analyse der Primer auf Chromosom 5 zeigten zehn der zwölf (83%) *metachronen Kolonkarzinome* Instabilitäten, wobei D5S1464 (5q13.1-13.2), D5S1472 (5q13.3-14.1), D5S209 (5q13.1-33.3), ein Primer, welcher den Bereich der instabilen Loci übergreift, und D5S1720 (5q21.3-22.1) die häufigsten Veränderungen aufwiesen, gefolgt von D5S586 (5q11.2-12.1). Somit waren die häufigsten Mikrosatelliteninstabilitäten in den Regionen des APC-Gens, in RASq21, einem GTPase aktivierendem Protein, welches die Zellproliferation und -differenzierung beeinflusst, und in der Region von JMY (Junction-mediating and regulatory protein – ein p300 Protein), einem Co-Aktivator für Transkriptionsfaktoren, welche p53 regulieren, aufgetreten.

Neun der 32 (28%) *synchronen Dickdarmkarzinome* waren auf Chromosom 5 instabil (alle MSI-L, sechsmal ein und dreimal zwei MSI), wobei insbesondere D5S1472 (5q13.3-14.1) und D5S209 (5q13.1-33.3) und somit Regionen von RASq21 betroffen waren.

Bei den *synchronen Magenkarzinomen* boten fünf der zwölf analysierten Karzinome (42%) auf Chromosom 5 instabile Mikrosatelliten, die mittels D5S1464 (5q13.1-13.2), D5S1404 (5q12.3-13.1) und D5S82 (5q14-21) besonders häufig nachweisbar waren. Hier waren somit der APC-Bereich und der Abschnitt von JMY betroffen.

Zusammenfassend war beim patientenunabhängigen Vergleich zwischen den drei Patientengruppen auffällig, dass bei den Kolonkarzinomen, im Gegensatz zu den Magenkarzinomen, keine Instabilitäten in D5S1491 (5q12.1-12.3), D5S1467 (5q14.1-14.3), D5S1404 (5q12.3-13.1) auftraten. Innerhalb der Kolonkarzinomgruppen waren keine Instabilitäten in D5S586 (5q11.2-12.1) und in D5S1720 (5q21.3-22.1) bei den synchronen Kolonkarzinomen im Vergleich zu den metachronen Kolonkarzinomen zu erfassen. Instabilitäten in D5S806 (5q13.2) und D5S209 (5q13.1-33.3) waren bei den Magenkarzinomen im Gegensatz zu den gesamten Kolonkarzinomen nicht nachweisbar. D5S1720 (5q21.3-22.1) war bei den synchronen Magenkarzinomen, ebenso wie bei den synchronen Kolonkarzinomen, nicht instabil.

MSI-Status auf Chromosom 5 patientenbezogen:

Ein Vergleich der MSI auf Chromosom 5 bei den Patientinnen mit *metachronen Kolonkarzinomen* lieferte bei einer Patientin einen deutlichen Unterschied zwischen Erst- und Zweitkarzinom: Das Erstkarzinom beinhaltete instabile Mikrosatelliten in den Markern D5S1464 (5q13.1-13.2), D5S209 (5q13.1-33.3), D5S1720 (5q21.3-22.1) und D5S82 (5q14-q21) und somit in den häufig betroffenen Regionen von Chromosom 5. Das Zweitkarzinom hatte hingegen nur einen instabilen Mikrosatellitenlocus: D5S209 (5q13.1-33.3). Bei dieser Patientin war zudem ein Unterschied in der Expression von hMLH1 zwischen beiden Karzinomen erfasst worden. (Details zu den MMR-Genen: siehe Kap. 4.4.1, Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.1)

Die MSI-Ergebnisse der *synchronen Kolonkarzinome* unterschieden patientenbezogen maximal um zwei instabile Loci: Die Doppelkarzinome von drei Patientinnen differierten in einem Primer (einmal in D5S1464 – 5q13.1-13.2 und zweimal in D5S1472 – 5q13.3-14.1), bei zwei Patientinnen in zwei Primern (D5S806 – 5q13.2 und D5S209 – 5q13.1-33.3 bzw. D5S1459 – 5q13.3 und D5S209 – 5q13.1-33.3), wobei das jeweilige andere Karzinom keine instabilen Mikrosatelliten auf Chromosom 5

beinhaltete. (Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.2)

Bei drei Patientinnen mit *synchronen Magenkarzinomen* unterschieden sich die jeweiligen Doppelkarzinome ebenfalls: Jeweils ein Karzinom wies instabile Mikrosatelliten Loci (zwei: D5S1472 – 5q13.3-14.1 und D5S82 – 5q14-q21; fünf: D5S1464 – 5q13.1-13.2, D5S1467 – 5q14.1-14.3, D5S1459 – 5q13.3, D5S1404 – 5q12.3-13.1 und D5S82 – 5q14-q21; oder sieben: D5S1491 – 5q12.1-12.3, D5S1464 – 5q13.1-13.2, D5S1472 – 5q13.3-14.1, D5S1459 – 5q13.3, D5S1404 – 5q12.3-13.1, D5S86 – 5q11.2-12.1 und D5S82 – 5q14-q21) auf Chromosom 5 auf, das andere Karzinom war bei zwei Patientinnen auf Chromosom 5 MSS, bei der dritten Patientin beinhaltet es drei MSI (D5S1491 – 5q12.1-12.3, D5S1404 – 5q12.3-13.1 und D5S1472 – 5q13.3-14.1) statt sieben (siehe oben). Zudem zeigten diese drei Patientinnen einen Unterschied in der Expression von hMLH1 bei den analysierten Doppelkarzinomen: Bei jeweils nur einem der beiden Karzinome konnte eine Expression von hMLH1 nachgewiesen werden. (Details zu den MMR-Genen: siehe Kap. 4.4.3, Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.3)

4.2 Identifikation von Loss of Heterozygosity (LOH)

Zusätzlich zur Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität erlaubt der HNPCC Microsatellite Instability Test Kit die relative Quantifikation der amplifizierten PCR-Produkte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität von Normal- und Tumorallelen und somit also auch die Entdeckung von Allelverlusten, welche als *loss of heterozygosity (LOH)* bezeichnet werden. LOH ist dabei als ein > 50% Höhenverlust des Peaks des Tumorallels im Vergleich zu desjenigen, des Normalallels definiert.

Um LOH zu berechnen bedient man sich folgender Formel:

$$\text{LOH} = \frac{\text{Peakhöhe Normalallel 2} / \text{Peakhöhe Normalallel 1}}{\text{Peakhöhe Tumorallel 2} / \text{Peakhöhe Tumorallel 1}}$$

Der Allelverlust wird durch einen Wert kleiner als 0,5 oder größer als 2,0 bestimmt¹¹⁸.

4.2.1 LOH-Analyse unter Verwendung des Referenzpanels

Die folgenden beiden Tabellen fassen die Ergebnisse der LOH-Analyse mit Häufigkeit und Verteilung von Karzinomen mit LOH (LOH+) und ohne LOH (LOH-) in den drei Subpopulationen zusammen:

	Metachrone Dickdarmkarzinome		Synchrone Dickdarmkarzinome		Synchrone Magenkarzinome	
Σ Ca	12		32		12	
LOH -	Ca/ Σ Ca:	6/12	Ca/ Σ Ca:	20/32	Ca/ Σ Ca:	10/12
LOH +	Ca/ Σ Ca:	6/12	Ca/ Σ Ca:	12/32	Ca/ Σ Ca:	2/12

Tabelle 24: Ergebnisse der LOH Analyse in den drei Subpopulationen (LOH = Loss of Heterozygosity, LOH + = Karzinom mit mindestens einem nachweisbarem LOH, LOH - = Karzinom ohne nachweisbare LOHs, Σ Ca = Summe der untersuchten Karzinome in der jeweiligen Subpopulation)

(n)Locus mit LOH/Ca	Metachrone Dickdarmkarzinome					Synchrone Dickdarmkarzinome					Synchrone Magenkarzinome				
1			5x ●					10x ●					2x ●		
2			●	●				●		●					
3								●	●	●					
4															
5															
Primer	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

Tabelle 25: Anzahl (n) und Verteilung der Loci mit Loss of Heterozygosity (LOH) in den drei Subpopulationen (● = LOH)

Patientenunabhängige Zusammenfassung des LOH-Status:

Sechs der zwölf (50%) *metachronen Kolonkarzinome* wiesen im Referenzpanel LOHs auf, die sechsmal den APC Locus betrafen und lediglich einmal D17S250.

Bei den *synchronen Dickdarmkarzinomen* zeigten zwölf der 32 Karzinome (37,5%) LOHs, die zwölfmal ebenfalls dem Primer APC zuzuordnen waren und einmal bei D17S250 auftraten. Im Gegensatz zu den metachronen Kolonkarzinomen beinhalteten die synchronen Kolonkarzinome zweimal LOHs in D2S123.

Nur bei zwei der zwölf (17%) *synchronen Magenkarzinomen* waren LOHs zu sehen, die dann ausschließlich im APC Locus nachzuweisen waren.

LOH-Status patientenbezogen:

Im Vergleich der *metachronen Kolondoppelkarzinome* innerhalb einer Patientinnen unterschieden sich bei zwei der sechs Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen die beiden Karzinome hinsichtlich der LOHs zwischen Erst- (LOH in APC und D17S250 bzw. nur in APC) und Zweitkarzinom (keine LOHs in beiden Karzinomen, dagegen in einem der Karzinome instabile Mikrosatelliten in BAT25, BAT26, APC und D2S123; bei diesem Karzinom zudem ein Expressionsverlust von HMLH1). (Details zu den MMR-Genen: siehe Kap. 4.4.1, Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.1)

Auch bei vier der 15 Patientinnen mit *synchronen Kolonkarzinomen* unterscheiden sich die beiden Karzinome hinsichtlich des Auftretens von LOH im APC Locus des Referenzpanels: Bei diesen Patientinnen beinhaltete jeweils nur eines der Karzinome LOH in APC, das andere Karzinom hingegen keinerlei Veränderungen im Referenzpanel. Bei einer Patientin konnte in einem der beiden Karzinome noch ein weiterer LOH in D17S250 – zusätzlich zu LOHs in APC und D2S123 – nachgewiesen werden. (Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.2)

Keine LOH Unterschiede traten innerhalb der Doppelkarzinome der Patientinnen mit *synchronen Magenkarzinomen* auf: Fünf Patientinnen beinhalteten keinerlei LOHs im Referenzpanel. Bei einer Patientin war bei beiden Karzinomen ein LOH im APC-Locus nachzuweisen. (Details zum Karzinomvergleich in der jeweiligen Subpopulation: siehe Kap. 4.5.3)

4.2.2 LOH-Analyse der Primer des Chromosoms 5: Vergleich der metachronen, synchronen Kolon- und Magenkarzinome

Außer des Referenzpanels¹¹² wurden noch *elf weitere Primer (Chromosom 5)* untersucht:

	Metachrone Dickdarmkarzinome								Synchrone Dickdarmkarzinome								Synchrone Magenkarzinome							
Σ Ca	12								32								12							
LOH - Karzinome	Ca/ Σ Ca:		2/12						Ca/ Σ Ca:		6/32						Ca/ Σ Ca:		6/12					
LOH + Karzinome	Ca/ Σ Ca:		10/12						Ca/ Σ Ca:		26/32						Ca/ Σ Ca:		6/12					
Σ -Karzinome	2	2	1	2	1	2	0	2	6	9	6	2	4	2	1	1	1	6	2	2	1	0	0	1
Instabile Loci (Primer)	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6

Tabelle 26: Anzahl (n) der Loci auf Chromosom 5 mit LOH und LOH-Status in den drei Subpopulationen.

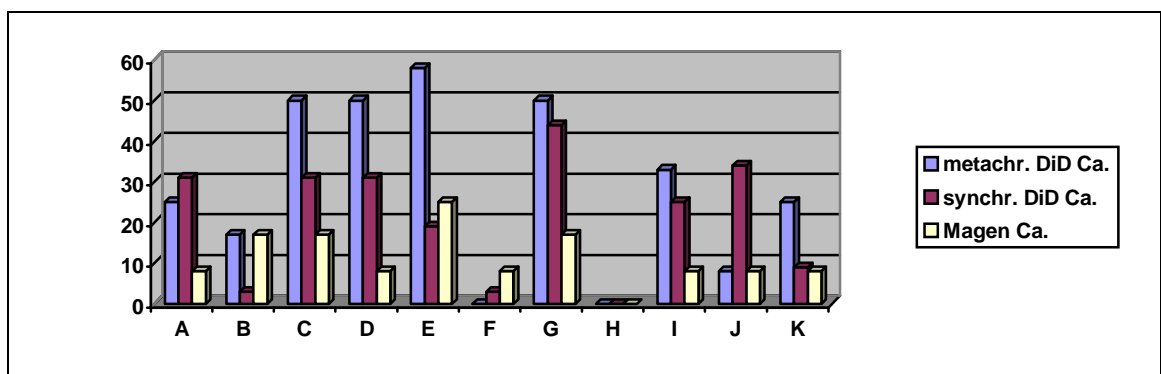
(LOH- = kein LOH vorhanden, LOH+ = LOH nachgewiesen, Σ Ca = Summe der Karzinome der jeweiligen Subpopulation)

Die vorangegangene Tabelle stellt die Verteilung der Karzinome mit (LOH +) oder ohne LOH (LOH -) innerhalb der Patientengruppen (jeweils als Karzinomanzahl (Ca) im Vergleich zur Gesamtzahl der Karzinome (Σ Ca) innerhalb der jeweiligen Gruppe) dar. Des Weiteren ist die Anzahl der Loci mit LOH pro Karzinom ergänzt.

Loss of Heterozygosity verteilte sich in seiner Gesamtzahl in folgender Weise zwischen den Primern auf Chromosom 5:

Primer	Metachrone Dickdarmkarzinome	Synchrone Dickdarmkarzinome	Synchrone Magenkarzinome
A (D5S1491) 5q12.1-12.3	3	10	1
B (D5S1464) 5q13.1-13.2	2	1	2
C (D5S1472) 5q13.3-14.1	6	10	2
D (D5S1467) 5q14.1-14.3	6	10	1
E (D5S1459) 5q13.3	7	6	3
F (D5S1404) 5q12.3-13.1	0	1	1
G (D5S806) 5q13.2	6	14	2
H (D5S586) 5q11.2-12.1	0	0	0
I (D5S209) 5q13.1-33.3	4	8	1
J (D5S1720) 5q21.3-q22.1	1	11	1
K (D5S82) 5q14-q21	3	3	1

Tabelle 27: Häufigkeit und Verteilung der Loci mit LOH in den drei Subpopulationen. (Besonders charakteristische Primer der jeweiligen Patientengruppen sind in der Tabelle hervorgehoben.)



Säulendiagramm 2: Graphische Darstellung der Primer (A-K) mit LOH des Chromosom 5 (in %) im Vergleich der drei Subpopulationen (metachr. DiD Ca. = metachrone Dickdarmkarzinome, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome, synchr. Magen Ca. = synchrone Magenkarzinome)

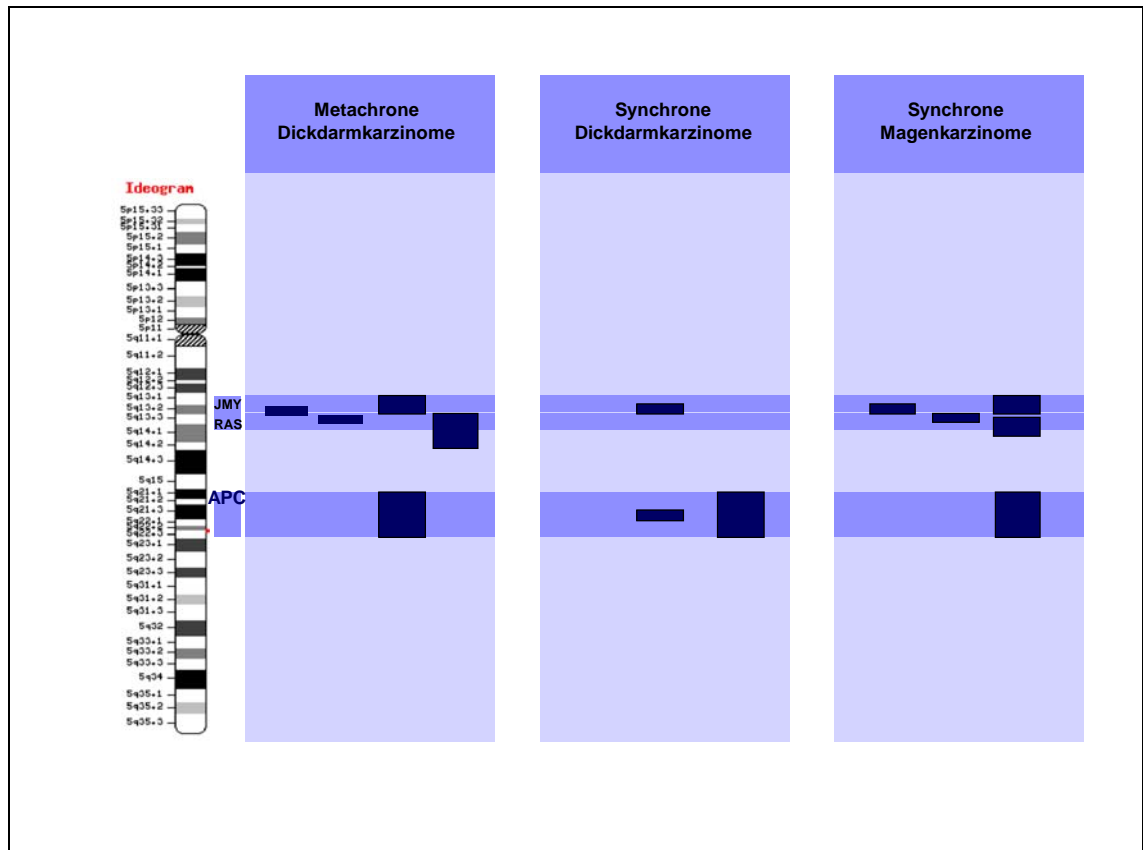


Abbildung 8: Verteilung der häufigen LOHs (dunkelblaue Bereiche) des Chromosoms 5 und des Referenzpanels (APC-Primer) in den drei Subpopulationen im graphischen Vergleich im Bezug zu Chromosom 5 und den Loci APC, RASq21 und JMY (Co-Faktor für p53) (hellblau hinterlegte Bereiche).

Patientenunabhängige Zusammenfassung des LOH-Status:

Bei den Primern von Chromosom 5 zeigten zehn von zwölf (83%) *metachronen Kolondoppelkarzinomen* LOHs. Diese traten überwiegend bei D5S1472 (5q13.3-14.1), D5S1467 (5q14.1-14.3) und D5S806 (5q13.2) und besonders bei D5S1459(5q13.3) auf. Somit waren häufige LOHs in den Bereichen 5q13.2-14.3 incl. JMY und RASq21, sowie in der APC-Region zu finden.

26 der 32 (81%) *synchrone Dickdarmdoppelkarzinome* gehörten ebenfalls der Gruppe mit LOHs an. Hierbei war D5S806 (5q13.2) der am häufigsten betroffene Primer, D5S1720 (5q21.3-22.1) folgte. Es waren somit die Region 5q13.2, der Bereich von JMY und APC betroffen.

Auch die Hälfte der *synchrone Magendoppelkarzinome* waren Karzinome mit LOH. Diese traten bei D5S1459 (5q13.3), gefolgt von D5S1464 (5q13.1-13.2), D5S1472 (5q13.3-14.1) und D5S806 (5q13.2) auf. In dieser Gruppe waren somit LOHs häufig von 5q13.1-14.1 (Region von JMY, RASq21) und in der APC-Region lokalisiert.

(Zu Zusammenhang zwischen LOH und Lokalisation der Karzinome siehe 4.3)

LOH-Status patientenbezogen:

Zusammenfassend unterschieden sich im individuellen Karzinomvergleich innerhalb der drei Patientengruppen Erst- und Zweitkarzinom hinsichtlich der LOHs auf Chromosom 5 bei zwei der sechs Patientinnen mit *metachronen Kolonkarzinomen* deutlich, da in nur einem der beiden Karzinome LOHs (5:0 bzw. 3:0) auftraten. Insgesamt unterschied sich die LOH Anzahl bei allen Karzinomen dieser Patientinnen. Gleiche LOHs traten dreimal in 5q13.3, zweimal in 5q13.3-14.1 und 5q13.2, sowie einmal in 5q14.1-14.3 und in 5q14-q21 bei beiden metachronen Kolonkarzinomen einer Patientin auf. (siehe hierzu auch Kap. 4.5.1)

Somit waren in den Abschnitten von APC, RASq21 und JMY häufig LOHs bei beiden metachronen Doppelkarzinomen zu finden.

In der Gruppe mit den *synchronen Kolonkarzinomen* traten keine LOH-Unterschiede hinsichtlich der LOH Anzahl zwischen den Karzinomen (innerhalb einer Patientin) bei acht der 15 Patientinnen auf. Bei fünf Patientin traten in beiden synchronen Kolonkarzinomen LOHs in 5q13.2 auf. Vier Patientinnen hatten in beiden Doppelkarzinomen Loss of Heterozygosity in 5q13.3-14.1 und in 5q14.1-14.3. Dreimal war ein LOH in 5q12.1-12.3 sowie in 5q13.1-33.3 in beiden synchronen Kolonkarzinomen einer Patientin zu finden. Bei zwei Patientinnen war in beiden synchronen Kolonkarzinomen LOH in 5q13.3 aufgetreten. Bei einer weiteren Patientin war zudem in beiden synchronen Kolonkarzinomen LOH in 5q14-21 nachweisbar. (siehe hierzu auch Kap. 4.5.2)

Somit waren die Regionen von JMY und APC häufig bei beiden synchronen Kolondoppelkarzinomen einer Patientin von LOH betroffen.

Auffallend war im individuellen Karzinomvergleich innerhalb jeweils einer Patientin, dass bei einer Patientin mit metachronen Kolondoppelkarzinomen das Erstkarzinom nur instabile Mikrosatelliten beinhaltete, dagegen das Zweitkarzinom nur LOHs (vgl. Kap. 4.2.1). Ein derartiger Unterschied war bei den Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen nicht ermittelt worden.

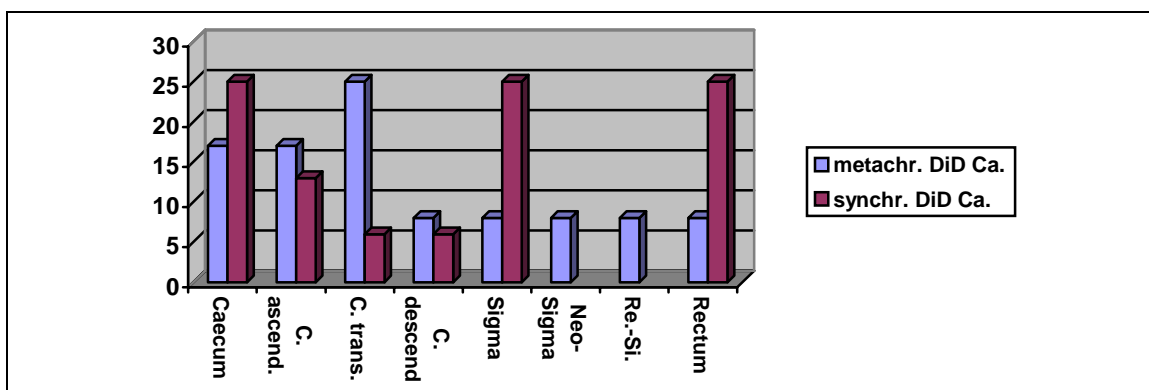
Bei den *synchronen Magenkarzinomen* wichen drei von sechs Patientinnen hinsichtlich ihrer LOH Anzahl voneinander ab (6:2, 3:2 bzw. je ein LOH in anderem Locus), zudem beinhaltete zweimal eines und einmal beide Doppelkarzinome zusätzliche instabile Mikrosatelliten (sechs LOH und zwei MSI; zwei LOH und fünf MSI; oder ein LOH und drei bzw. sieben MSI). Bei drei Patientinnen mit synchronen Magenkarzinomen unterschieden sich Erst- und Zweitkarzinom in der Anzahl der LOHs (siehe oben),

zudem im Verlust der Expression von hLMH1 und im zusätzlichen Auftreten von instabilen Mikrosatelliten (siehe oben) in den Karzinomen mit hMLH1 Expressionsverlust. Auffällig war, dass wenn ein LOH in 5q13.1-13.2 oder in 5q13.3-14.1 auftrat, dieser Loss of Heterozygosity jeweils in beiden Magenkarzinomen der betroffenen Patientin zu finden war. Ein LOH in 5q13.3 trat ebenfalls einmal in beiden Karzinomen einer Patientin auf, jedoch auch einmal in nur einem der beiden Karzinome einer anderen Patientin. (siehe hierzu auch Kap. 4.5.3)

Häufige LOHs traten somit bei beiden Magenkarzinomen einer Patientin in den Regionen von RASq21 und JMY auf.

4.3. Zusammenhang von Instabilität, Lokalisation und Klassifikation

Überblick über die unterschiedliche Verteilung der metachronen und synchronen Karzinome im Darm:



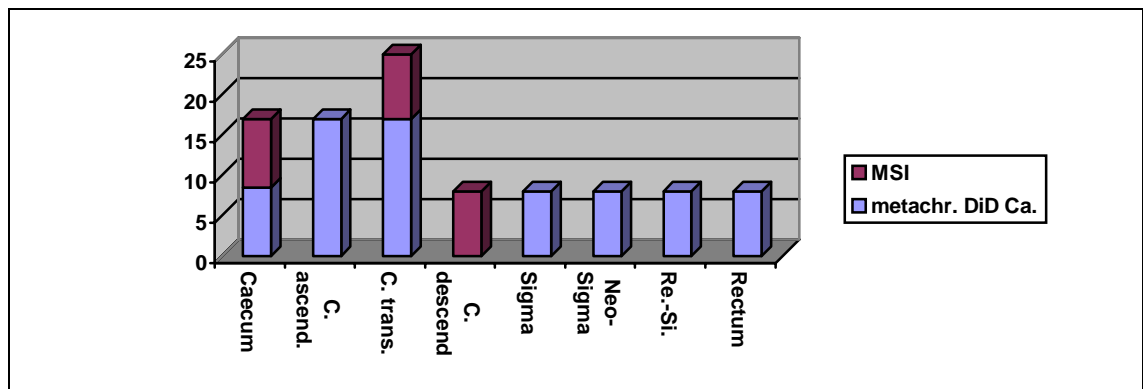
Säulendiagramm 3: Lokalisation der metachronen und synchronen Karzinome (in %) (metachr. DiD Ca. = metachrone Dickdarmkarzinome, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome)

4.3.1 Metachrone Dickdarmkarzinome

Die Mikrosatelliteninstabilität im Referenzpanel in Verbindung mit der Primärlokalisierung der metachronen Karzinome im Dickdarm zeigt die im Anschluss folgende **Tabelle 28**:

Lokalisation	Anzahl Ca/ Σ Ca	Cas mit MSI (alle Loci)	MSI 1 Locus	MSI >1 Locus (MSI Primer)				
Caecum	2/12	1Ca der 2Cas	0	■	■	■		■
Colon ascend.	2/12	0	0	0				
Colon trans.	3/12	1Ca der 3Cas	0	■	■	■		
Colon descend.	1/12	1Ca	0	■	■	■		■
Sigma	1/12	0	0	0				
Neo-Sigma	1/12	0	0	0				
Rectum-Sigma	1/12	0	0	0				
Rectum	1/12	0	0	0				
Primer				BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, Σ Ca = Summe der metachronen Kolonkarzinome, ■ = MSI)



Säulendiagramm 4: Lokalisation der metachronen Dickdarmkarzinome und deren MSI-Anteil (in %)

(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, metachr. DiD Ca = metachrone Dickdarmkarzinome)

Bei allen Patientinnen mit metachronen Kolondoppelkarzinomen waren die beiden Karzinome jeweils aus unterschiedlichen Darmabschnitten reseziert worden.

Drei der zwölf metachronen Karzinome (25%) traten im Colon transversum auf, je 17% (je zwei der zwölf Karzinome) folgten im Caecum und im Colon ascendens, zu je 8% (jeweils eines der zwölf Karzinome) verteilten sie sich in den anderen Darmabschnitten.

Das im Colon descendens aufgetretene Karzinom war Mikrosatelliten instabil. Im Caecum waren dies 50% und im Colon transversum 33% der Karzinome. Die Karzinome der anderen Darmabschnitte erwiesen sich dagegen stabil.

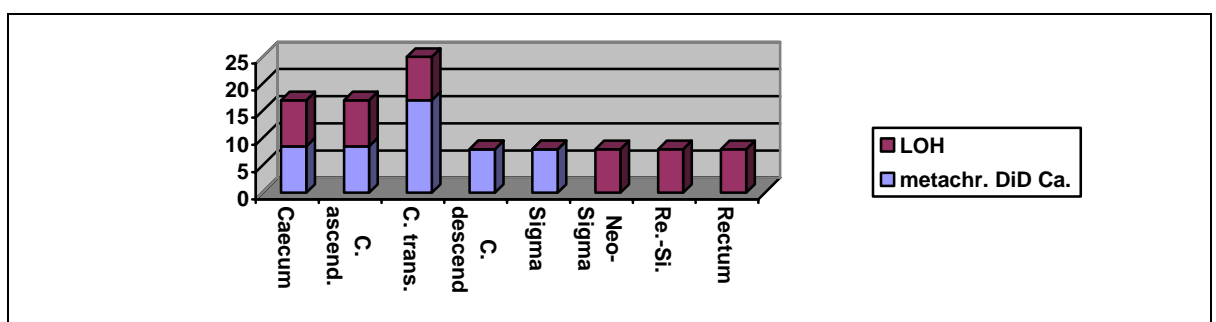
Im Caecum und Colon descendens waren die Primer BAT25, BAT26, APC und D2S123 instabil. Im Colon transversum fehlte die Instabilität des D2S123, die anderen drei Primer zeigten jedoch ebenso Instabilitäten.

Bei allen unterschiedlich lokalisierten metachronen Doppelkarzinomen (Karzinome jeweils einer Patientin im Vergleich), unterschieden sich nur die beiden Karzinome einer Patientin hinsichtlich ihres Mikrosatelliten Bildes: Ein Karzinom (Colon descendens Ca.) war hoch Mikrosatelliten instabil, das Zweitkarzinom (Caecumca.) war Mikrosatelliten stabil. (zum Karzinomvergleich siehe 4.5.1)

Die Primärlokalisierung der metachronen Karzinome im Dickdarm und deren LOHs im Referenzpanel werden aus nachfolgender **Tabelle 29** deutlich:

Lokalisation	Anzahl Ca/ Σ Ca	Cas mit LOH (alle Loci)	LOH 1 Locus					LOH >1 Locus (LOH Primer)				
Caecum	2/12	1Ca der 2Cas			●			0				
Colon ascend.	2/12	1Ca der 2Cas			●			0				
Colon trans.	3/12	1Ca der 3Cas			●			0				
Colon descend.	1/12	0	0					0				
Sigma	1/12	0	0					0				
Neo-Sigma	1/12	1Ca			●			0				
Rectum-Sigma	1/12	1Ca	0							●	●	
Rectum	1/12	1Ca			●			0				
Primer			BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

(LOH = LOH nachgewiesen, Σ Ca = Summe der Karzinome der metachronen Kolonkarzinome, ● = LOH)



Säulendiagramm 5: Lokalisation der metachronen Dickdarmkarzinome und deren LOH-Anteil (in %)

(LOH = Loss of Heterozygosity, metachr. DiD Ca. = metachrone Dickdarmkarzinome)

LOHs traten bei allen Karzinomen des Rectums auf, waren bei der Hälfte der Karzinome im Caecum und im Colon ascendens vertreten und erschienen in einem Drittel der Karzinome im Querkolon.

Auffällig hierbei war, dass immer der APC Primer betroffen war. Lediglich einmal traten zwei Loss of Heterozygosities gleichzeitig auf, so dass außer APC auch D17S250 Veränderungen zeigte.

Im Karzinomvergleich innerhalb einer Patientin unterschieden sich Erst- und Zweitkarzinom, bei unterschiedlicher Lokalisation, auch in der LOH Anzahl (LOH in APC und D17S250, Rectum-Sigma gegenüber kein LOH, Colon ascendens; bzw.: kein LOH, Colon descendens zu 1 LOH in APC, Caecum). Die übrigen Karzinome wichen bei ebenfalls unterschiedlicher Lokalisation im Darm nicht im LOH Bild voneinander ab.

Das Tumorstadium der metachronen Dickdarmkarzinome und die Mikrosatelliteninstabilität sowie die LOHs im Referenzpanel sind aus folgender **Tabelle 30** ersichtlich:

Tumorstadium	Karzinomanzahl	Karzinom: MSI	Karzinom: MSS	Karzinom: LOH +	Karzinom: LOH -
pT 4	2/12	0	2	1	1
pT 3	7/12	3	4	3	4
pT 2	2/12	0	2	2	0
pT 1	1/12	0	1	0	1
Σ aller Ca.	12	3/12	9/12	6/12	6/12

(MSI = Mikrosatelliten instabil, MSS = Mikrosatelliten stabil, LOH+ = Loss of Heterozygosity nachgewiesen, LOH- = kein Loss of Heterozygosity vorhanden, ΣCa = Summe der Karzinome der Subpopulation)

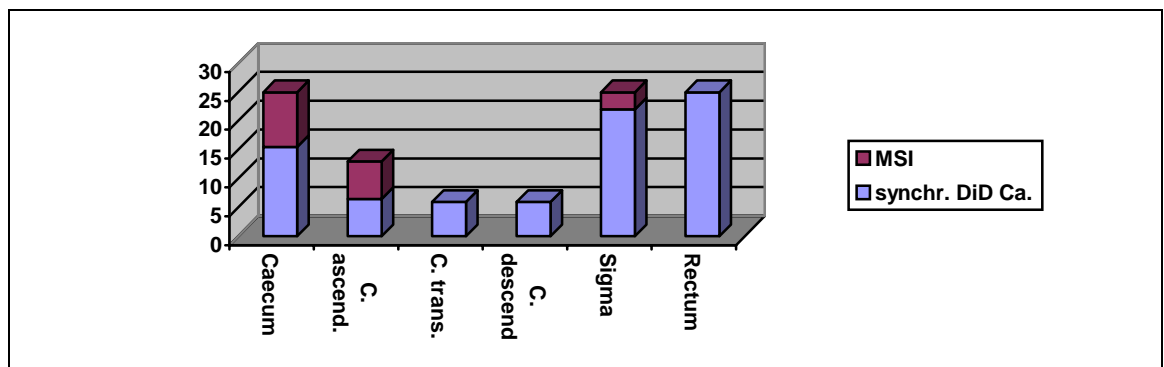
Alle pT4-Karzinome waren Mikrosatelliten stabil und die Hälfte bot LOHs. Bei den pT3-Karzinomen zeigten drei der sieben Karzinome dieser Gruppe LOHs, drei andere Karzinome waren Mikrosatelliten instabil (MSI-H), eines der Karzinome beinhaltete weder MSI noch LOH. Alle pT2-Karzinome wiesen keine Mikrosatelliteninstabilität auf, jedoch traten bei allen LOHs auf. Bei den Karzinomen der Kategorie pT1 waren keine Veränderungen nachweisbar. (zum Karzinomvergleich siehe auch 4.5.1)

4.3.2 Synchrone Dickdarmkarzinome

Die Mikrosatelliteninstabilität im Referenzpanel und die Primärlokalisation der synchronen Karzinome im Dickdarm werden im Folgenden in **Tabelle 31** aufgeschlüsselt:

Lokalisation	Anzahl Ca/ Σ Ca	Cas mit MSI (alle Loci)	MSI 1 Locus					MSI >1 Locus (MSI Primer)				
Caecum	8/32	3Cas der 8Cas					■	■	■	■	■	■
Colon ascend.	4/32	2Cas der 4Cas	0					■	■	■	■	■
Colon trans.	2/32	0	0					0				
Colon descend.	2/32	0	0					0				
Sigma	8/32	1Ca der 8Cas	■					0				
Rectum	8/32	0	0					0				
Primer			BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, Σ Ca = Summe der Karzinome der synchronen Kolonkarzinome, ■ = MSI)



Säulendiagramm 6: Lokalisation der synchronen Dickdarmkarzinome und deren MSI-Anteil (in %)

(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome)

Synchrone Kolonkarzinome waren überwiegend distal lokalisiert: Caecum, Sigma und Rektum beinhalteten je 25% (jeweils acht der 32 Karzinom), das Colon ascendens 13% (vier der 32 Karzinome), Colon transversum und descendens jeweils 6% der Karzinome (je zwei der 32 Karzinome).

Bei synchronen Dickdarmkarzinomen waren im Colon ascendens, im Caecum und im Sigma instabile Mikrosatelliten Loci zu finden. Karzinome aus anderen Darmabschnitten zeigten keine Mikrosatelliten Instabilität.

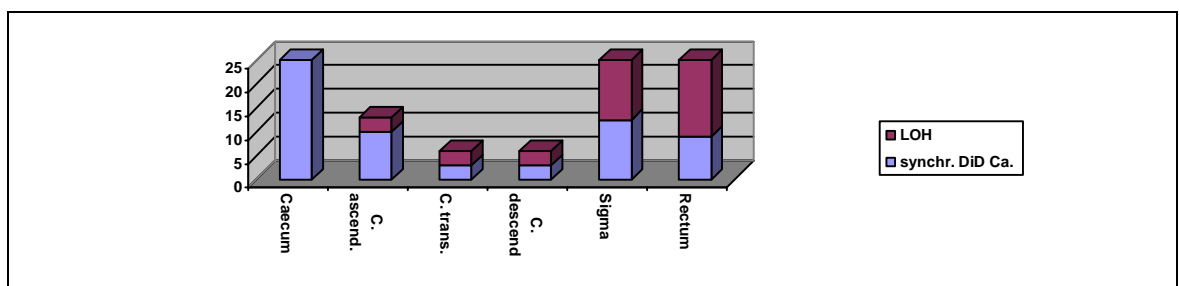
Im Caecum erwies sich bei einem Karzinom D2S123 instabil, bei zwei anderen Karzinomen waren jeweils die Primer BAT26 und D17S205 instabil. Diese beiden Primer zeigten auch bei zwei Karzinomen im Colon ascendens eine Instabilität. Im Sigma war BAT25 verändert.

Bei zehn der 15 Patientinnen waren die Karzinome im selben Darmabschnitt lokalisiert, bei vier Patientinnen waren die Karzinome in benachbarten Darmabschnitten aufgetreten. Bei zwei der fünfzehn Patientinnen unterschieden sich die beiden Karzinome, bei Lokalisation im jeweils selben Darmabschnitt (Doppelkarzinome einer Patientin im Caecum, bei der anderen Patientin im Sigma), in je einem instabilen Mikrosatelliten Locus (D2S123 bzw. BAT25). (zum Karzinomvergleich siehe 4.5.2)

Die Primärlokalisierung der synchronen Karzinome im Dickdarm und deren LOHs im Referenzpanel werden aus der anschließende **Tabelle 32** deutlich:

Lokalisation	Anzahl Ca/ Σ Ca	Cas mit LOH (alle Loci)	LOH 1 Locus					LOH >1 Locus (LOH Primer)			
Caecum	8/32	0	0					0			
Colon ascend.	4/32	1Ca der 4Cas			•			0			
Colon trans.	2/32	1Ca der 2Cas			•			0			
Colon descend.	2/32	1Ca der 2Cas			•			0			
Sigma	8/32	4Cas der 8Cas			4x •			0			
Rectum	8/32	5Cas der 8Cas			3x •				•	•	•
Primer			BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	BAT25	BAT26	APC	D17S250

(LOH = LOH nachgewiesen, Σ Ca = Summe der Karzinome der synchronen Kolonkarzinome, • = LOH)



Säulendiagramm 7: Lokalisation der synchronen Dickdarmkarzinome und deren LOH-Anteil (in %)

(LOH = Loss of Heterozygosity, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome)

Die Hälfte der Karzinome des Querkolons, des Colon descendens und des Sigma zeigten LOHs. Im Rectum traten bei fünf von acht dort lokalisierten Karzinomen LOHs auf. Im Colon ascendens war noch bei einem der vier dort lokalisierten Karzinome Loss of Heterozygosity nachzuweisen. Keine LOHs waren im Caecum zu finden.

LOHs waren hauptsächlich im APC Primer ersichtlich. Im Rectum zeigten zwei Karzinome darüber hinaus noch LOHs in D2S123 und eines der beiden noch zusätzlich in D17S250.

Im Karzinomvergleich innerhalb einer Patientin unterschieden sich die Doppelkarzinome um jeweils einen LOH im APC Locus des Referenzpanels zwischen Erst- und Zweitkarzinom bei zwei Patientinnen mit Karzinomen im selben Darmabschnitt (Doppelkarzinome im Sigma bzw. im Rectum), sowie bei zwei Patientinnen mit Karzinomen aus benachbarten Darmsegmenten (Doppelkarzinome im Colon ascendens und Colon transversum bzw. in Colon ascendens und Caecum). (zum Karzinomvergleich siehe auch 4.5.2)

Das Tumorstadium der synchronen Dickdarmkarzinome und die MSI sowie die LOHs im Referenzpanel sind aus folgender **Tabelle 33** ersichtlich:

Tumorstadium	Karzinomanzahl	Karzinom: MSI	Karzinom: MSS	Karzinom: LOH +	Karzinom: LOH -
pT 4	5/32	1	4	1	4
pT 3	13/32	2	11	5	8
pT 2	3/32	1	2	0	3
pT 1	11/32	2	9	6	5
Σ aller Ca.	32	6/32	26/32	12/32	20/32

(MSI = Mikrosatelliten instabil, MSS = Mikrosatelliten stabil, LOH+ = Loss of Heterozygosity nachgewiesen, LOH- = kein Loss of Heterozygosity vorhanden, ΣCa = Summe der Karzinome der Subpopulation)

Nur eines der fünf pT4-Karzinome beinhaltet einen instabil Mikrosatellitenlocus, ein anderes pT4-Karzinom bot LOHs. Elf der 13 (85%) pT3-Karzinome enthielten keine Mikrosatelliteninstabilität und acht von 13 (62%) pT3-Karzinomen keine LOHs. Zwei der drei (67%) pT2-Karzinome waren Mikrosatelliten stabil, keines bot einen LOH. Dagegen zeigten sechs von elf (55%) pT1-Karzinomen LOHs, neun von elf pT1-Karzinomen (82%) waren Mikrosatelliten stabil.

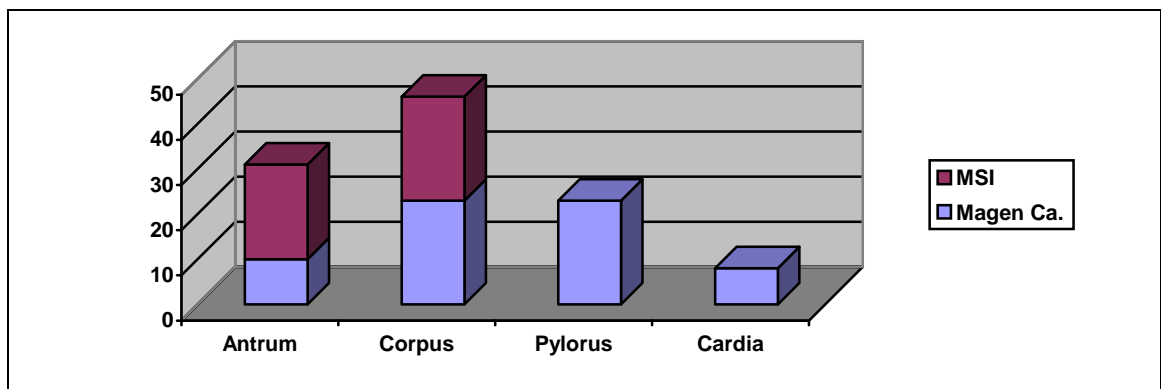
4.3.3 Synchroner Magenkarzinome

Die Primärlokalisierung der Karzinome im Magen und deren Mikrosatelliteninstabilität im Referenzpanel ist nachfolgend in **Tabelle 34** ersichtlich:

Lokalisation	Anzahl Ca/ Σ Ca	Cas mit MSI (alle Loci)	MSI 1 Locus	MSI >1 Locus (MSI Primer)				
Antrum	3/13	2Cas der 3Cas	0	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
Corpus	6/13	3Cas der 6Cas	0	■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
Pylorus	3/13	0	0	0				
Cardia	1/13	0	0	0				
Primer				BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123

(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, Σ Ca = Summe der synchronen Magenkarzinome, ■ = MSI)

(Ein Karzinom wies Anteile in Antrum und Corpus auf und wurde deshalb in dieser Tabelle beiden Bereichen zugeordnet.)



Säulendiagramm 8: Lokalisation der Karzinome und deren MSI-Anteil (in %)
(MSI = Mikrosatelliteninstabilität, Magen Ca. = Magenkarzinome)

Im Magen waren nur in Antrum und Corpus Mikrosatelliten instabile Karzinome zu finden. Ihr Anteil im Corpus lag bei 50%, im Antrum bei 67%.

BAT26 und APC zeigten bei allen fünf betroffenen Karzinomen Mikrosatelliten Instabilitäten. Im Antrum waren zwei Karzinome zudem in BAT25 instabil, eines der Karzinome außerdem noch in D17S250 und D2S123. Diese fünf instabilen Loci wies auch eines der drei instabilen Corpuskarzinome auf. Ein anderes Corpuskarzinom war außer in BAT26 und APC auch noch in D17S250 und D2S123 instabil.

Die Magendoppelkarzinome jeder Patientin waren jeweils aus unterschiedlichen Magenabschnitten reseziert worden. Die Karzinome einer Patientin differierten in der Gesamtzahl der Mikrosatelliten instabilen Loci (3:2). Bei zwei Patientinnen war jeweils eines der Doppelkarzinome (bei beiden Patientinnen im Pylorus) Mikrosatelliten stabil, das andere (jeweils im Corpus) Mikrosatelliten hoch instabil. (vgl. hierzu auch 4.5.3)

Die Primärlokalisation der synchronen Magenkarzinome und deren LOHs im Referenzpanel werden aus der anschließende **Tabelle 35** deutlich:

Lokalisation	Anzahl Ca/ΣCa	Cas mit LOH (alle Loci)	LOH 1 Locus					LOH >1 Locus (LOH Primer)
Antrum	3/13	0	0					0
Corpus	6/13	1			•			0
Pylorus	3/13	1			•			0
Cardia	1/13	0	0					0
Primer			BAT25	BAT26	APC	D17S250	D2S123	

(LOH = LOH nachgewiesen, Σ Ca = Summe synchronen Magenkarzinome, • = LOH)
(Ein Karzinom wies Anteile in Antrum und Corpus auf und wurde deshalb in dieser Tabelle beiden Bereichen zugeordnet.)

LOHs waren nur bei Karzinomen im Corpus und Pylorus zu finden: Sie erschienen bei einem von drei Karzinomen (33%) im Pylorus und traten in einem von sechs (17%) Corpuskarzinomen auf.

Bei durchwegs verschiedener Lokalisation der Karzinome im Magen lagen keine LOH Unterschiede zwischen den Doppelkarzinomen der einzelnen Patientinnen vor: Loss of heterozygosity (APC-Locus) konnte nur bei den Doppelkarzinomen einer Patientin (Karzinome in Corpus und Pylorus) nachgewiesen werden. (zum Karzinomvergleich siehe auch 4.5.3)

Das Tumorstadium der Magenkarzinome und die Mikrosatelliteninstabilität sowie die LOHs im Referenzpanel verhielten sich zueinander wie folgt:

Tumorstadium	Karzinomanzahl	Karzinom: MSI	Karzinom: MSS	Karzinom: LOH +	Karzinom: LOH -
pT 4	1/12	0	1	0	1
pT 3	2/12	0	2	0	2
pT 2	5/12	2	3	2	3
pT 1	4/12	2	2	0	4
Σ aller Ca.	12	4/12	8/12	2/12	10/12

Tabelle 36: Zusammenfassung von Tumorstadium, Mikrosatelliteninstabilität und LOH-Nachweis bei den Patientinnen mit Magenkarzinomen.

(MSI = Mikrosatelliten instabil, MSS = Mikrosatelliten stabil, LOH+ = Loss of Heterozygosity nachgewiesen, LOH- = kein Loss of Heterozygosity vorhanden, ΣCa = Summe der Karzinome der Subpopulation)

Alle pT3-Karzinome und das pT4-Karzinom, zeigten keine Instabilitäten der Mikrosatellitenloci und keine LOHs. Zwei von fünf pT2-Karzinomen boten sowohl stabile Mikrosatelliten als auch keine LOHs, bei einem pT2-Karzinom traten sowohl instabile Mikrosatellitenloci als auch ein LOH auf, die beiden weiteren pT2-Karzinome beinhalteten entweder nur instabile Mikrosatellitenloci oder einen Loss of Heterozygosity. Die Hälfte aller pT1-Karzinome war mikrosatelliteninstabil. Bei keinem Karzinom dieser Gruppe war ein LOH nachzuweisen.

4.4 Mismatchrepairgene

Die häufigste Ursache der MSI beim kolorektalen Karzinom stellt der Funktionsverlust eines Mismatchrepairgens (häufig hMLH1 (16 Exons) und/oder hMSH2 (19 Exons)) dar⁷⁷. Des Weiteren sind hMLH1 (3p13.3) und hMSH2 (2q16) auch bei HNPCC-Patienten zu je einem Drittel mutiert. hMLH6-Mutationen wurde ebenfalls in HNPCC-Familien gefunden¹¹⁹.

Bei sporadischen Magenkarzinomen wurde praktisch ein ausschließlicher Expressionsverlust des Repairgens hMLH1, durch Methylierung des Promotors, nachgewiesen^{120, 121}.

In dieser Arbeit wurden die Repairgene hMLH1, hMSH2 und hMSH6 immunhistochemisch analysiert:

4.4.1 Metachrone Kolonkarzinome

Die Mismatchreparagen-Expressionsverluste der zwölf metachronen Karzinome traten zu 25% in hMLH1 auf. Keinen Verlust der Expression beinhalteten hMSH2 und hMSH6.

Der Expressionsverlust von hMLH1 trat einmal bei beiden Karzinomen einer Patientin auf (beide Karzinome hoch Mikrosatelliten instabil), das zweite Mal war nur eines der beiden Karzinome (ebenfalls Mikrosatelliten hoch instabil) einer Patientin betroffen. (Details zum Karzinomvergleich siehe unter 4.5.1)

4.4.2 Synchrone Kolonkarzinome

In keinem der drei analysierten Mismatchreparogene traten Expressionsverluste bei den 32 synchronen Kolonkarzinomen auf.

4.4.3 Synchrone Magenkarzinome

hMSH6 und hMSH2 waren unveränderte MMR-Gene bei den Magenkarzinomen. Ein Verlust der Expression war zu 25% bei hMLH1 nachweisbar.

Bei drei der sechs Patientinnen unterschieden sich die beiden synchronen Doppelkarzinome in der Expression von hMLH1: Das Karzinom mit der fehlenden Expression von hMLH1 war im Gegensatz zum jeweiligen synchronen Zweitkarzinom im Referenzpanel Mikrosatelliten hoch instabil. (Details zum Karzinomvergleich siehe unter 4.5.3)

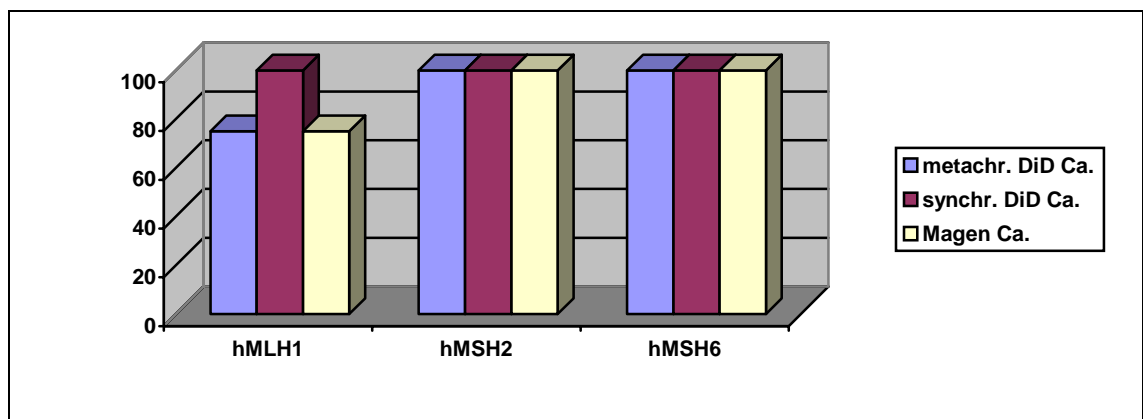
4.4.4 Zusammenfassung der Immunhistologie

	hMLH1	hMSH2	hMSH6
Kolon, metachron (Σ 12 Karzinome)	9/12	12/12	12/12
Kolon, synchron (Σ 32 Karzinome)	32/32	32/32	32/32
Magen, synchron (Σ 12 Karzinome)	9/12	12/12	12/12
Σ 56 Karzinome	50 von 56 Karzinomen	56 von 56 Karzinomen	56 von 56 Karzinomen

Tabelle 37: Anzahl der Karzinome in den drei Patientengruppen mit Expression der Mismatchreparaturen.

(Σ n Karzinome = Anzahl der Karzinome der Subpopulation)

Im Folgenden werden die Daten nochmals graphisch veranschaulicht:



Säulendiagramm 9: MMR-Genexpression bei Kolon- und Magenkarzinomen (in %) (metachr. DiD Ca. = metachrone Dickdarmkarzinome, synchr. DiD Ca. = synchrone Dickdarmkarzinome, synchr. Magen Ca = synchrone Magenkarzinome)

Bei allen 56 untersuchten Ausgangskarzinomproben waren keine Veränderungen in der Expression in den Mismatchreparaturen hMSH2 und hMSH6 aufgetreten.

hMLH1 war bei den metachronen Kolonkarzinomen und den Magenkarzinomen das Repairgen, welches zu je 25% Verluste in der Expression aufwies.

Vom Expressionsverlust waren nicht immer beide Karzinome einer Patientin betroffen.

4.5 Daten im Vergleich

4.5.1 Metachrone Kolonkarzinome

klin. Daten												
Pat.-Nr.	1		2		3		4		5		22	
*Jahr	1929		1937		1914		1940		1912		1925	
Tumor	DiD meta		DiD meta		DiD meta		DiD meta		DiD meta		DiD meta	
	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2
Histopatho.												
Lokalisation	C.tr.	Si.	N-Si.	Re.	Cae.	C.tr.	Re-Si.	C.as.	C.de.	Cae.	C.as.	C.tr.
Grading	2	2	2	2	3	2 muz.	2	3	2	3	2	2
pT	4	3	3	2	3	3	3	1	3	4	3	2
pN	0	0	0	0	1	1	2	0	3	3	0	0
MSI-Analyse												
ΣMSI-Panel	0	0	0	0	4	3	0	0	4	0	0	0
ΣLOH-Panel	0	0	1	1	0	0	2	0	0	1	1	1
<i>Mononukleotide</i>												
BAT25					■	■			■			
BAT26					■	■			■			
<i>Dinukleotide</i>												
APC			o	o	■	■	o		■	o(h)	o	o
D17S250							o					
D2S123					■				■			
A						o	o			o		
B			■	■	■	o			■			o
C	■	■ o	■ o	o		■	o				o	o
D				o		o	o			o	o	o
E	o	o	o	o	■	■	o	o		o		
F												
G			o	o	■	■	o			o	o	o
H				■	■	■						
I			■	o		■	o		■	■ o		o
J					■				■		■	■ o
K						■	o		■		o	o
ΣMSI-Chr. 5	1	1	3	2	5	6	0	0	4	1	1	1
ΣLOH-Chr. 5	1	2	3	5	0	3	7	1	0	5	4	7
Immunhisto.												
hMLH1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
hMSH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 38: Daten der metachronen Kolonkarzinome im Vergleich

(Ca ≡ Karzinom, C.tr. ≡ Colon transversum, Si. ≡ Sigma, N-Si. ≡ Neosigma, Re. ≡ Rektum, Cae. ≡ Caecum, Re-Si. ≡ rektosigmoidaler Übergang, C.as. ≡ Colon ascendens, C.de. ≡ Colon descendens, muz. ≡ muzinös, *Jahr ≡ Geburtsjahr, Chr. 5 ≡ Chromosom 5, A-K ≡ Abkürzungen der Primer/Loci, ■ ≡ MSI, o ≡ LOH)

Obige Tabelle stellt die ermittelten Daten der Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen im Überblick dar.

Hieraus wird ersichtlich, dass gleiche MMR-Genexpression und gleiches Grading bei anderem Tumorstadium drei der Patientinnen (Pat. 1, 2 und 22) mit metachronen Kolonkarzinomen zeigten. Des Weiteren waren bei den Karzinomen der Patientinnen 2 und 22 die selben LOHs im Referenzpanel, sowie gleiche instabile Mikrosatelliten Loci (Pat. 1) und gleiche LOHs (Pat. 22) auf Chromosom 5 nachweisbar.

Ebenso gleiche MMR-Genexpression bei gleichem Tumorstadium, jedoch anderem Grading bot Patientin 3. Bei ihr waren außerdem noch gleiche instabile Mikrosatelliten Loci im Referenzpanel belegbar. Auffällig war zudem, dass beide Karzinome einen Verlust der Expression von hMLH1 vorwiesen.

Bei Patientin 4 lagen bei gleicher MMR-Expression ein anderes Tumorstadium, Grading und andere LOHs im Referenzpanel und auch auf Chromosom 5 vor.

In hMLH1 differierten die beiden Karzinome von Patientin 5, die außerdem anderes Grading, pT-Stadium und andere instabile Mikrosatelliten im Referenzpanel, sowie andere LOHs und instabile Mikrosatelliten auf Chromosom 5 inne hatten.

Im individuellen Vergleich der beiden Karzinome innerhalb jeweils einer Patientin unterschieden sich die beiden Karzinome bei einer Patientin am deutlichsten: Eines war distal, das zweite proximal lokalisiert, zudem beinhaltete das Erstkarzinom nur Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI-H), keine LOHs und zeigte einen Verlust der Expression von hMLH1, wohingegen beim Zweitkarzinom LOHs auftraten und keine Veränderungen in hMLH1 nachweisbar war. Bei vier Patientinnen dieser Karzinomgruppe waren bei beiden Karzinomen die Expression von hMLH1 vorhanden. Bei den Doppelkarzinomen einer der Patientinnen dieser Gruppe war es bei beiden Karzinomen zu einem Expressionsverlust von hMLH1 gekommen. Die Karzinome dieser Patientin waren zudem Mikrosatelliten hoch-instabil.

Die nachfolgende **Tabelle 39** zeigt das Verhältnis von pT-Stadium und Grading von Erstkarzinom (links) zu Zweitkarzinom (rechts in der Tabelle):

pT1		pT1
pT2		pT2
pT3		pT3
pT4		pT4
G1		G1
G2		G2
G3		G3

Die Tabelle verdeutlicht, dass beinahe alle Zweitkarzinome in einem früheren Tumorstadium erfasst und reseziert wurden, was möglicherweise auf die Nachsorge im Anschluss an die Erstoperation zurückzuführen ist.

4.5.2 Synchrone Kolonkarzinome

klin. Daten																
Pat.-Nr.	6		7		8		9		10		11		12			
*Jahr	1924		1921		1913		1935		1935		1929		1955			
Tumor	DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn			
	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4
Histopatho.																
Lokalisation	Cae.	Si.	Cae.	Cae.	C.tr.	C.de.	Si.	Si.	C.as.	Cae.	Si.	Si.	Cae.	Cae.	C.as.	C.as.
Grading	2	3	3	3 muz.	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3
pT	3	4	4	4	2	3	1	3	3	1	1	2	3	3	1	1
pN	3	3	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	1	1	1	1
MSI-Analyse																
ΣMSI-Panel	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2
ΣLOH-Panel	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Mononukleotide																
BAT25												■				
BAT26													■	■	■	■
Dinukleotide																
APC							o	o	o							
D17S250													■	■	■	■
D2S123			■													
A							o	o	o				o	o	o	
B	■															
C			o	o		■	■	■					o		o	
D	o	o					o	o(a)	o	o(a)						
E			o	o(a)								o				
F																
G	o	o	o	o(a)			o	o(a)					■			
H																
I			o	o(a)		o	o	o					■			
J			o	o(a)											o	o
K																
ΣMSI-Chr. 5	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0
ΣLOH-Chr. 5	2	2	5	5	0	1	4	4	2	1	0	1	2	1	3	1
Immunhisto.																
hMLH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 40: Synchrone Kolonkarzinome –1.Teil (Daten im Vergleich)

(Ca = Karzinom, Cae. = Caecum, Si. = Sigma, C.tr. = Colon transversum, C.de. = Colon descendens, C.as. = Colon ascendens, muz. = muzinös, *Jahr = Geburtsjahr, Chr. 5 = Chromosom 5, A-K = Abkürzungen der Primer/Loci, ■ = MSI, o = LOH)

klin. Daten																
Pat.-Nr.	13		14		15		16		17		18		19		20	
*Jahr	1904		1930		1910		1920		1922		1913		1916		1938	
Tumor	DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn		DiD syn	
	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2
Histopatho.																
Lokal.	C.as.	C.tr.	Cae.	Cae.	Re.	Re.	Si.	Si.	Re.	Re.	C.de.	Si.	Re.	Re.	Re.	Re.
Grading	2	2	3	3	2 muz	3 muz	1	2	2	2	3	2	2	3 muz	2	3
pT	4	1	2	3	3	3	1	3	1	1	3	3	3	1	4	1
pN	1	0	1	1	1	1	0	2	0	0	2	2	2	2	1	1
MSI-Analyse																
ΣMSI-Panel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΣLOH-Panel	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	3	2
<i>Mononukleotide</i>																
BAT25																
BAT26																
<i>Dinukleotide</i>																
APC		o						o	o	o	o	o(a)		o	o	o
D17S250															o	
D2S123															o	o
A	o	o						o		o						
B										o						
C								o		o	o	o	o	o	■	
D		o							o	o	o	o				
E								o		■	o	o(a)		■		
F											o					
G		o					o(a)	o		o	o	o(a)	o		o	
H																
I										■	o	o(a)	■		o	
J		o								o	o	o	o	o		o
K										o	o	o(a)	■			
ΣMSI-Chr. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	1	0
ΣLOH-Chr. 5	1	4	0	0	0	0	1	4	1	7	8	6	3	2	2	1
Immunhisto.																
hMLH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 40: Synchroner Kolonkarzinome – 2. Teil (Daten im Vergleich)

(Ca = Karzinom, C.as. = Colon ascendens, C.tr. = Colon transversum, Cae. = Caecum, Re. = Rektum, Si. = Sigma, C.de. = Colon descendens, muz = muzinös, *Jahr = Geburtsjahr, Chr. 5 = Chromosom 5, A-K = Abkürzungen der Primer/Loci, ■ = MSI, o = LOH)

Die vorangegangenen Tabellen stellen die ermittelten Daten der Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen im Überblick dar.

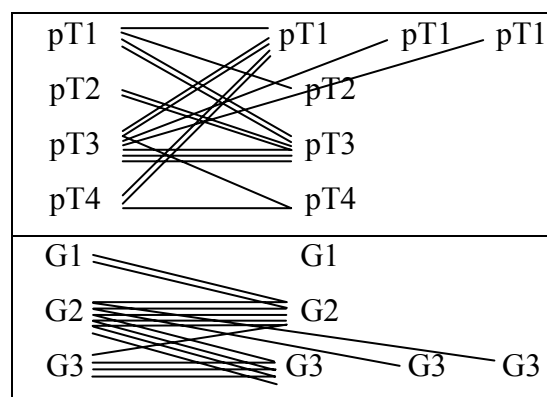
Drei der Patientinnen (Pat. 7, 12 und 17) zeigten Karzinome mit gleichen MMR-Gen-Muster, gleichem Grading und gleichem pT-Stadium. Des Weiteren korrelierten instabile Mikrosatelliten Loci (Pat. 12) und LOH (Pat. 17) im Referenzpanel, sowie die LOHs (Pat. 7, 12) auf Chromosom 5.

Ebenso gleiche MMR-Genexpression bei abweichendem Grading boten die Karzinome von zwei Patientinnen (Pat. 15 und 18), die dasselbe PT-Stadium aufwiesen. Auch die LOHs stimmten bei Patientin 18 überein.

Bei selber Immunhistologie differierten bei zehn Patientinnen (Pat. 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 19 und 20) die Karzinome im pT-Stadium, sowie bei fünf Patientinnen im Grading (Pat. 6, 8, 16, 19, 20) im Gegensatz zu den anderen fünf Patientinnen (Pat. 9, 10, 11, 13 und 14), die im Grading nicht voneinander abwichen. Keine Unterschiede waren bei den LOHs im Referenzpanel (Pat. 9, 20), instabilen Mikrosatelliten Loci auf Chromosom 5 (Pat. 9) und bei LOHs auf Chromosom 5 (Pat. 6, 9, 10) nachweisbar. Die Karzinome von zwei Patientinnen (Pat. 14 und 15) waren Mikrosatelliten stabil, und es wurden ebenso keine LOH-Veränderungen manifest.

Im Karzinomvergleich zwischen den synchronen Dickdarmdoppelkarzinomen jeweils einer Patientin zeigten sich keine so deutlichen Unterschiede wie bei den Patientinnen mit metachronen Kolondoppelkarzinomen. Bei keiner der Patientinnen war ein Verlust der Expression bei einem MMR-Gen ermittelt worden. Bei vier Patientinnen unterschieden sich Erst- und Zweitkarzinom in der Zahl der LOHs. Bei zwei Patientinnen war ein Karzinom stabil, das zweite Karzinom beinhaltete je eine Mikrosatelliteninstabilität und einen LOH.

Die nachfolgende **Tabelle 41** zeigt das Verhältnis von pT-Stadium und Grading zwischen Erstkarzinom (links in der Tabelle), Zweitkarzinom (Tabellenmitte) sowie Dritt- und Viertkarzinom (Pat. 12) (rechts in der Tabelle):



Der überwiegende Anteil der synchronen Kolonkarzinome wurde in einem fortgeschrittenem Tumorstadium reseziert.

4.5.3 Synchrone Magenkarzinome

klin. Daten												
Patient-Nr.	21		23		24		25		26		27	
Jahrgang	1955		1931		1913		1914		1930		1920	
Tumor	Magen		Magen		Magen		Magen		Magen		Magen	
	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2	Ca1	Ca2
Histopatho	Siegelring											
Lokalisation	kl.Kur.	gr.Kur.	Cardia	Präpy.	Corpus	Pylorus	Corpus	Antr.	Pylorus	Ant/Cor	Antr.	kl.Kur.
Grading	3	3	3	2	2	2	3	3	2	2	3	3
pT	1	1	3	2	2	2	3	3	2	1	2	1
pN	0	0	2	2	0	0	2	2	0	0	2	2
Lauren	diff.	diff.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
MSI-Analyse												
ΣMSI-Panel	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	3	2
ΣLOH-Panel	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Mononukleotide												
BAT25										■	■	
BAT26					■(h)					■	■	■(h)
Dinukleotide												
APC					■(h) o	o				■	■	■
D17S250					■(h)					■		
D2S123					■(h)					■		
A					o(h)						■	■(h)
B					■				o	■ o		■(h)
C					o	o					■	■(h)
D										■	o	
E					o	o			o	■		■(h)
F										■	■	■ o(h)
G					o				o			
H												■
I										o		
J					o(h)							
K					■ o			■		■		■(h)
ΣMSI-Chr. 5	0	0	0	0	2	0	0	1	0	5	3	7
ΣLOH-Chr. 5	0	0	0	0	6	2	0	0	3	2	1	1
Immunhisto												
hMLH1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
hMSH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hMSH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 42: Daten der synchronen Magenkarzinome im Vergleich

(Ca = Karzinom, kl.Kur. = kleine Kurvatur, gr.Kur. = große Kurvatur, Präpy. = Präpylorus, Ant/Cor = Antrum/Corpus, Antr. = Antrum, diff. = diffus, int. = intestinal, (h) = heterogen, A-K = Abkürzungen der Primer/Loci, ■ = MSI, o = LOH)

Die obige Tabelle stellt die ermittelten Daten der Patientinnen mit synchronen Magenkarzinomen im Überblick dar.

Bei drei der Patientinnen (Pat. 24, 26 und 27) differierten die Karzinome in hMLH1, zeigten aber dennoch gleiches Grading (Pat. 24, 26, 27) bei gleichem pT-Stadium (Pat. 24). Trotz gleichen Tumorstadiums wichen die Karzinome von Patientin 24 aber im LOH-Muster auf Chromosom 5 und bei der MSI-Analyse voneinander ab. Andere Mikrosatelliten Instabilitäten boten auch die Karzinome der Patientin 26 (MSI-H,

Karzinom 2 versus MSS, Karzinom 1), im Gegensatz zu Patientin 27 (zwei MSI-H Karzinome).

Gleiche MMR-Genexpression, gleiches Grading und pT-Stadium waren bei zwei Patientinnen (Pat. 21 und 25) zu belegen. Darüber hinaus waren die Karzinome der Patientin 21 Mikrosatelliten stabil und beinhalteten keinen LOH.

Ebenso keine instabilen Mikrosatelliten Loci und kein LOH war bei Patientin 23 nachweisbar, deren Karzinome in anderem pT-Stadium und Grading vorlagen.

Bei drei der Patientinnen mit synchronen Magendoppelkarzinomen unterschieden sich beide Karzinome jeweils einer Patientin in der Expression von hMLH1 und zudem bei zwei der Patientinnen in der Mikrosatelliteninstabilität (MSS versus MSI-H). Bei einer dieser drei Patientinnen waren beide Karzinom MSI-H, bei jedoch differenter Expression von hMLH1.

Die **Tabelle 43** stellt das Verhältnis von pT-Stadium und Grading zwischen beiden Karzinomen dar:

pT1	————	pT1
pT2	=====	pT2
pT3	————	pT3
pT4		pT4
G1		G1
G2	=====	G2
G3	=====	G3

Synchrone Magenkarzinome wurden überwiegend in einem frühen Tumorstadium reseziert, waren jedoch dann überwiegend entdifferenziert.

4.6 MSI-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und dem APC-Primer (Referenzpanel, Chromosom 5)

Im folgenden Abschnitt werden Unterschiede von Mikrosatelliteninstabilitäten zwischen den analysierten Primern des Chromosoms 5 und dem APC-Primer des Referenzpanels, welcher ebenfalls auf Chromosom 5 lokalisiert ist, ersichtlich:

(Lokalisationsbezogen erfolgte die vergleichende Darstellung bereits in Kapitel 4.1.2 in der Tabelle)

Metachrone Kolonkarzinome: MSI-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ MSI
■		■			■		■	■		■		5
■			■		■		■	■	■		■	6
■		■							■	■	■	4
			■									1
			■									1
		■	■						■			3
		■						■				2
									■			1
										■		1
										■		1
												0
												0
Σ	0	4	4	0	2	0	2	3	4	4	2	25

Tabelle 44: Vergleich von Mikrosatelliteninstabilität im APC-Locus mit Mikrosatelliteninstabilität in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei metachronen Kolonkarzinomen

(Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ MSI = Summe der instabilen Mikrosatellitenloci auf Chromosom 5 je Karzinom, ■ \equiv MSI)

Drei Karzinome zeigten auf Chromosom 5 eine Mikrosatelliteninstabilität des APC-Referenzpanel-Primers. Diese waren auch in den weiteren analysierten Primern des Chromosoms 5 Mikrosatelliten instabil (je vier, fünf und sechs Primer – wobei sechs Instabilitäten in den APC-Primer assoziierten Loci auftraten und ansonsten 5q13.1-13.2, 5q13.3, 5q13.2 und 5q11.2-12.1 jeweils zwei instabile Mikrosatelliten aufwiesen). Darüber hinaus waren sieben weitere Karzinome von vier Patientinnen in den Primern des Chromosoms 5 instabil, ohne dass diese im Referenzpanel auf Chromosom 5 eine Instabilität aufwiesen.

Insgesamt je vier Mikrosatelliteninstabilitäten boten 5q13.1-13.2, 5q13.3-14.1, 5q13.1-33.3 und 5q21.3-22.1. Drei Instabilitäten zeigte 5q11.2-12.1, gefolgt von je zwei Instabilitäten bei 5q13.3, 5q13.2 und 5q14-21.

Zwei Karzinome waren Mikrosatelliten stabil.

Synchrone Kolonkarzinome: MSI-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ MSI
		■										1
			■									1
			■									1
			■									1
							■		■			2
					■				■			2
									■		■	2
					■							1
			■									1
												23x0
Σ	0	1	4	0	2	0	1	0	3	0	1	12

Tabelle 45: Vergleich von Mikrosatelliteninstabilität im APC-Locus mit Mikrosatelliteninstabilität in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei synchronen Kolonkarzinomen

(Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ MSI = Summe der instabilen Mikrosatellitenloci auf Chromosom 5 je Karzinom, ■ \equiv MSI)

Alle synchronen Dickdarmkarzinome waren im Referenzpanel auf Chromosom 5 (APC-Locus) Mikrosatelliten stabil. Neun synchrone Karzinome zeigten dagegen Mikrosatelliteninstabilitäten bei den auf Chromosom 5 analysierten Primern dieser Arbeit.

Am häufigsten betroffen war 5q13.3-14.1 (vier Mikrosatelliteninstabilitäten), gefolgt von 5q13.1-33.3 (drei Mikrosatelliteninstabilitäten) und 5q13.3 (zwei Mikrosatelliteninstabilitäten). 5q13.1-13.2, 5q13.2 und 5q14-21 waren ebenfalls je einmal instabil.

Die übrigen 23 Karzinome waren in den analysierten Loci des Chromosoms 5 Mikrosatelliten stabil.

Magenkarzinome: MSI-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ MSI
■		■									■	2
■		■		■	■	■					■	5
■	■		■			■						3
■	■	■	■		■	■		■			■	7
											■	1
												7x0
Σ	2	3	2	1	2	3	0	1	0	0	4	18

Tabelle 46: Vergleich von Mikrosatelliteninstabilität im APC-Locus mit Mikrosatelliteninstabilität in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei Magenkarzinomen (*Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ MSI = Summe der instabilen Mikrosatellitenloci auf Chromosom 5 je Karzinom, ■ = MSI*)

Mikrosatelliteninstabilitäten im APC-Locus des Referenzpanels boten vier Karzinome des Magens. Diese Karzinome wiesen ebenso in weiteren Primern des Chromosom 5 Instabilitäten auf (zwei, drei, fünf oder sieben Primer – wobei je eine Instabilität in 5q14.1-14.3 und in 5q11.2-12.1, jeweils zwei Instabilitäten in 5q12.1-12.3, in 5q13.3 und in 5q13.3-14.1, drei Mikrosatelliteninstabilitäten in 5q13.1-13.2, sowie in 5q12.3-13.1 und in 5q14-q21 nachweisbar waren). Darüber hinaus zeigte ein weiteres Karzinom eine Mikrosatelliteninstabilität auf Chromosom 5, welches im Referenzpanel keine Instabilität auf Chromosom 5 bot.

5q14-21 beinhaltete insgesamt die zahlreichsten Mikrosatelliteninstabilitäten (vier), gefolgt von 5q13.1-13.2 und 5q12.3-13.1 mit derselben Häufigkeit (je drei) an Mikrosatelliteninstabilitäten. Daran schlossen sich 5q12.1-12.3, 5q13.3-14.1 und 5q13.3 mit gleicher Zahl an Instabilitäten (je zwei MSI), gefolgt von 5q14.1-14.3 und 5q11.2-12.1 (je ein Mikrosatelliteninstabilität) an.

Sieben Karzinome waren Mikrosatelliten stabil.

Zusammengefasst war auf Chromosom 5 bei den *metachronen Kolonkarzinomen* der Bereich von 5q13.1-14.1((D5S1464), (D5S1472)) eine häufig instabile Region. In diesem Bereich heben sich aufgrund ihrer instabilen Mikrosatelliten die Genabschnitte 5q13.2 (D5S806) und 5q13.3 (D5S1459) hervor. Diese Region beinhaltet RASq21 ein GTPase-Activating Protein, welches die Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung innehat, sowie den Genabschnitt für das Junction-mediating and regulatory protein (JMY), welches als Co-Faktor für Transkriptionsfaktoren p53 reguliert. Darüber hinaus zeigten sich weitere Mikrosatelliteninstabilitäten in den

Regionen von 5q13.1-33.3 (D5S209) und 5q21.3-22.1 (D5S1720), in welchen der APC Locus (5q21-22) lokalisiert ist.

Bei den *synchronen Kolonkarzinomen* traten Mikrosatelliteninstabilitäten im Genabschnitt von 5q13.1-33.3 (D5S209) und innerhalb dieses Abschnitts im Bereich von 5q13.3-14.1 (D5S1472) und 5q13.3 (D5S1459) auf, sodass auch bei den synchronen Kolonkarzinomen Instabilitäten im Bereich von RASq21 nachweisbar waren.

Mikrosatelliteninstabile Genabschnitte auf Chromosom 5 waren bei den *synchronen Magenkarzinomen* die Bereiche von 5q12.1-14.1 ((D5S1464), (D5S1404), (D5S1491), (D5S1472), (D5S1459)) sowie 5q14-q21 (D5S82). Somit waren auch bei den synchronen Magenkarzinomen die Bereiche um APC (5q21-22) und RASq21 häufig instabil.

4.7 LOH-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und dem APC-Primer (Referenzpanel, Chromosom 5)

Im folgenden Abschnitt werden Unterschiede von Loss of Heterozygosity zwischen den analysierten Primern des Chromosoms 5 und dem APC-Primer, welcher dem Referenzpanel angehört und ebenfalls auf Chromosom 5 lokalisiert ist, ersichtlich:

(Auf das Chromosom 5 lokalisationsbezogen erfolgte die vergleichende Darstellung bereits in Kapitel 4.2.2)

Metachrone Kolonkarzinome: LOH-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ LOH
○			○		○		○					3
○			○	○	○		○		○			5
○	○		○	○	○		○		○		○	7
○	○			○	○		○		○			5
○			○	○			○				○	4
○		○	○	○			○		○	○	○	7
					○							1
			○		○							2
	○	○		○								3
					○							1
												0
												0
Σ	3	2	6	6	7	0	6	0	4	1	3	38

Tabelle 47: Vergleich von Loss of Heterozygosity im APC-Locus mit Loss of Heterozygosity in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei metachronen Kolonkarzinomen

(Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ LOH = Loss of Heterozygosity auf Chromosom 5 je Karzinom, ○ ≡ LOH)

Sechs Karzinome zeigten auf Chromosom 5 einen LOH des APC-Locus des Referenzpanels. Diese verloren auch in den weiteren analysierten Primern des Chromosoms 5 ihre Heterozygosität (drei bis sieben Primer – insgesamt je ein LOH in 5q21.3-22.1 und in 5q13.1-13.2, zwei LOHs in 5q12.1-12.3, drei LOHs in 5q14-q21, je vier LOHs in 5q13.3 und in 5q13.1-33.3, je fünf LOHs in 5q13.3-14.1 und in 5q14.1-14.3, sowie sechs LOHs in 5q13.2). Darüber hinaus beinhalteten vier weitere Karzinome in den Primern des Chromosoms 5 LOHs, ohne dass diese im Referenzpanel weitere LOHs auf Chromosom 5 enthielten.

Insgesamt sieben LOHs traten bei 5q13.3 auf. Je sechs LOHs boten 5q13.3-14.1, 5q14.1-14.3 und 5q13.2. Vier LOHs zeigte 5q13.1-33.3, gefolgt von je drei LOHs bei 5q12.1-12.3 und 5q14-21, sowie zwei LOHs bei 5q13.1-13.2. Nur ein LOH trat bei 5q21.3-22.1 auf.

Zwei Karzinome beinhalteten keinerlei LOH.

Synchrone Kolonkarzinome: LOH-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ LOH
○	○			○			○			○		4
○	○			○			○		○			4
○	○			○			○		○			4
○	○			○								2
○	○		○		○		○					4
○				○								1
○	○	○	○	○			○			○	○	7
○			○	○	○	○	○		○	○	○	8
○			○		○		○		○	○	○	6
○			○							○		2
○							○		○			2
○										○		1
	○											1
							○					1
			○				○			○		3
				○			○					2
				○			○					2
			○		○		○		○	○		5
			○		○		○		○	○		5
									○			1
				○								1
					○							1
	○		○									2
	○											1
	○		○							○		3
										○		1
												6x0
Σ	10	1	10	10	6	1	14	0	8	11	3	74

Tabelle 48: Vergleich von Loss of Heterozygosity im APC-Locus mit Loss of Heterozygosity in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei synchronen Kolonkarzinomen

(Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ LOH = Loss of Heterozygosity auf Chromosom 5 je Karzinom, ○ ≡ LOH)

Zwölf synchrone Dickdarmkarzinome zeigten im Referenzpanel (APC-Locus) LOH und zudem LOHs bei einem bis acht weiteren Primern des Chromosoms 5 (insgesamt je ein LOH in 5q13.1-13.2 und in 5q12.3-13.1, jeweils drei LOHs in 5q13.3 sowie in 5q14-21, je fünf LOHs in 5q13.3-14.1 und in 5q13.1-33.3, jeweils sechs LOHs in 5q12.1-12.3 und in 5q21.3-22.1, sieben LOHs in 5q14.1-14.3, acht LOHs in 5q13.2). Vierzehn weitere synchrone Karzinome verloren darüber hinaus ihre Heterozygosität in den auf Chromosom 5 analysierten Primern dieser Arbeit (ein bis fünf Primer – wobei je drei

LOHs in 5q14.1-14.3, in 5q13.3 und in 5q13.1-33.3, vier LOHs in 5q12.1-12.3, je fünf LOHs in 5q13.3-14.1 und in 5q21.3-22.1, sowie sechs LOHs in 5q13.2 auftraten).

Insgesamt am häufigsten betroffen war 5q13.2 (vierzehn LOHs), gefolgt von 5q21.3-22.1 mit elf LOHs und 5q12.1-12.3, 5q13.3-14.1 und 5q14.1-14.3 (je zehn LOHs), sowie 5q13.1-33.3 (acht LOHs) und 5q13.3 (sechs LOHs). Drei LOHs bot 5q14-21, nur jeweils einen LOH 5q13.1-13.2 und 5q12.3-11.1.

Sechs Karzinome beinhalteten keinen LOH.

Magenkarzinome: LOH-Vergleich der Primer auf Chromosom 5

APC Ref.Panel 5q21-q22	A 5q12.1- 12.3	B 5q13.1- 13.2	C 5q13.3- 14.1	D 5q14.1- 14.3	E 5q13.3	F 5q12.3- 13.1	G 5q13.2	H 5q11.2- 12.1	I 5q13.1- 33.3	J 5q21.3- 22.1	K 5q14- 21	Σ LOH
○	○		○		○		○			○	○	6
○			○		○							2
		○			○		○					3
		○							○			2
				○								1
						○						1
												6x0
Σ	1	2	2	1	3	1	2	0	1	1	1	15

Tabelle 49: Vergleich von Loss of Heterozygosity im APC-Locus mit Loss of Heterozygosity in weiteren Primern auf Chromosom 5 bei Magenkarzinomen

(Kursiv: Primer I, J, K: Lokalisation im APC-Bereich; Σ LOH = Loss of Heterozygosity auf Chromosom 5 je Karzinom, ○ ≡ LOH)

LOH des APC-Locus des Referenzpanels boten zwei Karzinome des Magens. Diese Karzinome wiesen ebenso auf Chromosom 5 LOHs auf (sechs und zwei Primer – wobei je einmal LOHs in jeweils 5q12.1-12.3, in 5q13.2, in 5q21.3-22.1 und in 5q14-21 auftraten, jeweils zweimal waren LOHs in 5q13.3-14.1 und in 5q13.3 nachweisbar). Darüber hinaus zeigten vier weitere Karzinome LOHs auf Chromosom 5 (ein bis drei Primer je Karzinom – wobei je ein LOH in 5q14.1-14.3, in 5q13.3, in 5q12.3-13.1, in 5q13.2 und in 5q13.1-33.3, zwei LOHs in 5q13.1-13.2 auftraten), bei welchen im Referenzpanel auf Chromosom 5 keine LOHs nachweisbar waren.

5q13.3 beinhaltete insgesamt die zahlreichsten LOHs (drei), gefolgt von 5q13.1-13.2, 5q13.3-14.1 und 5q13.2 mit derselben Häufigkeit (je zwei) an LOHs. Daran schlossen sich die Primer 5q12.1-12.3, 5q14.1-14.3, 5q12.3-13.1, 5q13.1-33.3, 5q21.3-22.1 und 5q14-21 mit jeweils einem LOH an.

Bei sechs Magenkarzinomen war kein LOH nachweisbar.

Zusammengefasst traten bei den *metachronen Kolonkarzinomen* die häufigsten Verluste der Heterozygotie in der Genregion von 5q13.2-14.3 ((D5S1472), (D5S1467), (D5S1459), (D5S806)) auf – somit waren RASq21 (5q13.3) und JMY (5q13.2) häufig von LOHs betroffen. Weitere LOHs waren in den Regionen von 5q13.1-33.3 (D5S209) lokalisiert – hier waren neben der bereits aufgeführten Region um 5q13, zudem die Abschnitten zwischen 5q14-q21 (D5S82) und 5q21.3-22.1 (D5S1720) und somit die APC-Region häufig von LOHs betroffen.

Bei den *synchronen Kolonkarzinomen* waren LOHs vor allem von 5q12.1-12.3 (D5S1491), sowie von 5q13.2-14.3 (D5S1472, D5S1467; 5q13.3 (D5S1459) – RASq21 und 5q13.2 (D5S806) – JMY) lokalisiert. Darüber hinaus waren weitere LOHs im Genabschnitt um 5q21 (5q21.3-22.1 (D5S1720)) und somit in der APC Region aufgetreten.

LOHs bei den *synchronen Magenkarzinomen* waren in den Regionen um 5q13.1-14.1 (D5S1464, D5S1472) bevorzugt zu finden – und hier im Speziellen im Bereich von RASq21 (5q13.3 (D5S1459)) und JMY (5q13.2 (D5S806)). Darüber hinaus traten im Primer D5S209 (5q13.1-33.3) LOHs auf, wobei weitere LOHs neben dem Bereich um 5q13 im Abschnitt um 5q21 lokalisiert waren und somit die APC Region betrafen.

V. Diskussion

32 synchrone und zwölf metachrone Kolonkarzinome sowie zwölf synchrone Magenkarzinome wurden auf ihre Lokalisation, auf das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität oder chromosomaler Instabilität, im Hinblick auf Übereinstimmungen oder Abweichungen mit den Bethesda-Kriterien und hinsichtlich der unterschiedlichen Wege bei der Karzinogenese untersucht.

Abschließend werden in Zusammenschau der Ergebnisse aus der Mikrosatelliten- und LOH-Analyse der neu etablierten Primer des Chromosom 5 weitere Möglichkeiten für die gastroenterologische Onkologie aufgezeigt.

5.1 Verteilung der Lokalisationen der meta-, synchronen Kolon- und Magenkarzinome im Darm

Deutlich über die Hälfte aller kolorektalen Karzinome sind in Rektum und Sigma lokalisiert¹²², wobei etwa 75% der synchronen Kolonkarzinome ebenfalls in Rektum und Sigma, 50% der metachronen Mehrfachkarzinome hingegen im proximalen Kolon (Caecum, Colon ascendens und Colon transversum) gelegen sind.

Die 1926 ermittelte Verteilung der Magenkarzinome (50% Pylorusregion, 10% Cardia) hat sich bis heute etwas geändert: Die Zahl der Cardiakarzinome hat sich verdoppelt bis verdreifacht; die Mehrzahl der Magenkarzinome ist jedoch im Antrum- und Korpusbereich lokalisiert^{40, 123}.

In dieser Arbeit wurden zwölf metachrone Kolonkarzinome von sechs Patientinnen, 32 synchrone Kolonkarzinome von 15 Patientinnen und zwölf synchrone Magenkarzinome von sechs Patientinnen analysiert:

5.1.1 Lokalisation der meta- und synchronen Kolonkarzinome

Die metachronen Kolonkarzinome (zwölf Karzinome von sechs Patientinnen) dieser Arbeit waren vorwiegend proximal im Colon transversum (drei von zwölf Karzinomen), Caecum (zwei von zwölf Karzinomen) und Colon ascendens (zwei von zwölf Karzinomen) lokalisiert. Die synchronen Dickdarmkarzinome (32 Karzinome von 15 Patientinnen) waren überwiegend in Caecum (acht von 32 Karzinomen), Sigma (acht von 32 Karzinomen) und Rectum (acht von 32 Karzinomen) gelegen.

Bei allen Patientinnen mit metachronen Kolondoppelkarzinomen waren die beiden Karzinome jeweils in verschiedenen Darmabschnitten reseziert worden. Dagegen waren bei zehn der fünfzehn Patientinnen mit synchronen Kolondoppelkarzinomen die Karzinome jeweils im selben Darmabschnitt lokalisiert, bei vier Patientinnen waren die Karzinome in benachbarten Darmabschnitten aufgetreten.

Metachrone Mehrfachkarzinome waren nach Ergebnissen von Welch JP. und Masubuchi et al. zu über 50% im proximalen Kolon (Caecum, Colon ascendens und transversum) gelegen.

Diese Daten stehen mit unseren Zahlen in Einklang, da 58% (sieben der zwölf Karzinome) der bearbeiteten metachronen Kolonkarzinome dieser Arbeit ebenso vom Caecum bis zur linken Flexur aufgetreten waren (die restlichen 42% waren vom Colon descendens bis zum Rektum lokalisiert).

Synchrone Mehrfachkarzinome waren in einer Studie von Burns FJ.¹²⁴ zu etwa 75% in Rektum und Sigma lokalisiert.

In Sigma und Rektum wurden 50% der analysierten synchronen Kolonkarzinome reseziert, das heißt etwa 25% weniger als in der Untersuchungspopulation von Burns.

5.1.2 Lokalisation der meta- und synchronen Kolonkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten

(Zur Mikrosatellitenanalyse siehe 5.2; Lokalisation in diesem Abschnitt vorab.)

Karzinome mit instabilen Mikrosatelliten traten bei unseren ausgewerteten Kolonkarzinomen proximal im Caecum (eines der beiden (50%) dort lokalisierten metachronen Kolonkarzinome (MSI-H) und drei der acht (38%) synchronen Kolonkarzinome, davon zwei MSI-H und eines MSI-L), im Colon ascendens (zwei der vier (50%) synchronen Karzinome, beide MSI-H) und Colon transversum (eins von drei (33%) metachronen Karzinomen, MSI-H) auf. Nur zu einem geringen Prozentsatz waren auch im Colon descendens (8%, eines von zwölf metachronen Karzinomen, MSI-H) und im Sigma (13%, eines von acht synchrone Karzinomen, MSI-L) distale Kolonkarzinome in dieser Arbeit instabil.

In einer Studie der Arbeitsgruppe Kim HS. et al.¹²⁵, in welcher sie Doppelkarzinome des Kolons und Magens analysierten, waren Mikrosatelliten instabile Karzinome im proximalen oder rechtsseitigen Kolon lokalisiert. Allerdings differenzierten sie nicht

zwischen meta- beziehungsweise synchron aufgetretenen Kolonkarzinomen hinsichtlich der Lokalisation.

Auch Boland et al. fanden MSI-H kolorektale Karzinome vorwiegend im proximalen Kolon, ihr Karzinomkollektiv setzte sich jedoch nicht aus Doppelkarzinomen zusammen.

Zusammenfassend waren MSI-Karzinome bei Kim et al. proximal und rechtsseitig und bei Boland ebenso überwiegend proximal nachweisbar.

Die Arbeitsgruppe um Masubuchi S. et al. konnte in metachronen Doppelkarzinomen, welche im distalen Kolon und Rektum wuchsen, eine signifikant höhere Prozentzahl an Karzinomen mit instabilen Mikrosatelliten nachweisen, als bei Patienten mit singulären Karzinomen (87% versus 0%). Im proximalen Kolon konnten sie keinen solchen Unterschied feststellen.

Ähnlich wie bei Masubuchi, der einen hohen Prozentsatz an metachronen MSI-Karzinomen im distalen Kolon und Rektum erfasst hatte, war auch bei unseren metachronen distalen Kolonkarzinomen im Colon descendens ein MSI-H Karzinom enthalten. Dies war jedoch nur ein Anteil von 8% aller metachronen Karzinome und darüber hinaus waren alle unsere Karzinome des Rektums Mikrosatelliten stabil (MSS).

5.1.3 Lokalisation der synchronen Magenkarzinome

Die Magenkarzinome (zwölf Karzinome von sechs Patientinnen, davon ein Karzinom mit Anteilen in Antrum und Corpus) dieser Arbeit waren zu 8% (ein Karzinom) in der Cardia, zu 46% (sechs Karzinome) im Corpus, zu 23% (drei Karzinome) im Antrum und zu 23% (drei Karzinome) im Pylorus lokalisiert, wobei die Doppelkarzinome der Patientinnen jeweils in verschiedenen Abschnitten des Magens reseziert wurden.

In einer Übersichtsarbeit von Wanebo HJ. et al.¹²⁶ waren von 18.365 Karzinomen 31% im oberen Drittel, 14% im mittleren und 26% der Karzinome im unteren Drittel des Magens lokalisiert; in 10% war der ganze Magen betroffen (in 19% war die Lokalisation nicht angegeben).

Im Gegensatz zu dieser Verteilung waren die Mehrzahl unserer Karzinome im Corpus- und Antrumbereich (Σ 69%), gefolgt von Pylorus (23%) und Cardia (8%) gelegen.

5.1.4 Lokalisation der synchronen Magenkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten

(Zur Mikrosatellitenanalyse siehe 5.2; Lokalisation in diesem Abschnitt vorab.)

Es waren nur im Antrum und Corpus Mikrosatelliten instabile Karzinome (MSI-H, fünf der insgesamt zwölf Magenkarzinome) zu finden. Ihr Anteil lag im Corpus bei 50% (drei der sechs Corpuskarzinome) im Antrum bei 67% (zwei der drei Antrumkarzinome).

Bei ihrer Analyse beobachteten Halling et al.¹²⁷ eine mittlere oder distale Lokalisation der Karzinome, die MSI-H beinhalteten. Des Weiteren zeigten Strickler et al., dass 83% der instabilen Karzinome im distalen Drittel des Magens nachweisbar waren. Bei Wu MS. et al.¹²⁸ waren MSI-H Karzinome antral lokalisiert und gehörten dem intestinalen Typ an. Shiao et al.¹²⁹ konnten eine Assoziation von MSI und LOH mit Cardiakarzinomen (6-fach höhere Anzahl als bei Karzinomen in Antrum oder Corpus) belegen.

Diese MSI-Lokalisationen in Magenmitte und im distalen Anteil (Halling et al. und Strickler), sowie antral (Wu et al.), stimmten mit unseren Ergebnissen, die ebenfalls Mikrosatelliten instabile Karzinome (MSI-H) in Corpus und Antrum ermittelten, überein. Ebenso gehörten alle unsere MSI-H Magenkarzinome, wie bei Wu MS et al., dem intestinalen Typ an. (siehe hierzu auch 5.2.3)

Die Assoziation von LOH mit Cardiakarzinomen (Shiao et. al.) konnte in unserer Arbeit jedoch nicht gezeigt werden, da das einzige Cardiakarzinom dieser Arbeit keinerlei Veränderungen aufwies.

5.2 Vergleich des Auftretens von Mikrosatelliteninstabilität und chromosomaler Instabilität bei metachronen und synchronen Kolon- und Magenkarzinomen

Ein Mechanismus in der Entstehung maligner Karzinome ist die genetische Instabilität in Form von Längenpolymorphismen der Mikrosatelliten (Replication Error/Mutator Pathway: 20%). Die Prävalenz dieser Instabilität der repetitiven Nukleotidsequenzen variiert mit der Lokalisation des Primärtumors, mit den getesteten Mikrosatelliten (Chromosom, Zahl und Repeat-Typ), sowie mit dem Tumortyp^{21, 81, 130}.

Ein anderer Mechanismus (Tumor Suppressor Pathway: 80%) folgt der Dysplasie-Karzinom-Sequenz, bei welcher es zu einer Akkumulation von groben genetischen Schäden mit Aneuploidisierung und chromosomaler Instabilität (CIN) kommt. Hierbei

kommt es zu Mutationen der Tumorsuppressorgene mit Verlust eines Allels (LOH) und Mutation des verbliebenen Allels.

In dieser Arbeit wurden Karzinome von 27 Patientinnen (sechs Patientinnen mit metachronen, fünfzehn Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen; sechs Patientinnen mit synchronen Magenkarzinomen) auf das Vorliegen des Instabilitätsphänotypus untersucht. Hierzu wurde für die Mikrosatellitenanalyse genomische DNA aus Normal- und Tumorgewebe isoliert, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und mittels ABI ausgewertet.

Die vergleichbaren Publikationen über Mikrosatelliteninstabilität unterschieden sich zum Teil hinsichtlich ihres Anteils an instabilen Loci an der Gesamtzahl der analysierten Primer, sowie in der Frage, in wie vielen Loci ein Längenpolymorphismus vorliegen muss, um das Karzinom als hoch-instabiles Karzinom zu klassifizieren. – In dieser Arbeit erfolgte die Einteilung in MSS, MSI-L und MSI-H Karzinome gemäß den Empfehlungen des National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition (siehe 4.1)^{112, 117}.

In den folgenden Gliederungspunkten werden zunächst MSI und CIN bei den Kolonkarzinomen und im Anschluss bei den Magenkarzinomen diskutiert.

(Zur Verteilung der Lokalisation der meta- und synchronen Kolonkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten siehe 5.1.2. Zur Lokalisation der Magenkarzinome mit instabilen Mikrosatelliten siehe 5.1.4.)

5.2.1 Mikrosatelliteninstabilität bei Kolonkarzinomen

Bei den metachronen Kolonkarzinomen traten im Caecum (eins von zwei Karzinomen), Colon transversum (eins von drei Karzinomen) und im Colon descendens (ein Karzinom) Mikrosatelliten instabile Karzinome (alles MSI-H Karzinome) auf. Karzinome der anderen Darmabschnitte (insgesamt sechs Karzinome) waren stabil (MSS). 75% (neun von zwölf) metachrone Kolonkarzinome dieser Arbeit waren im Referenzpanel¹¹² Mikrosatelliten stabile Karzinome (MSS). 25% (drei von zwölf Karzinomen) gehörten der Gruppe der MSI-H Karzinome an.

Synchrone Dickdarmkarzinome waren im Caecum (drei von acht Karzinomen, 2x MSI-H, 1x MSI-L), Colon ascendens (zwei von vier Karzinomen, beide MSI-H) und Sigma (eins von acht Karzinomen, MSI-L) instabil. Im Referenzpanel für HNPCC waren 81% (26 von 32 Karzinomen) Mikrosatelliten stabile Karzinome (MSS), 6% waren MSI-L

(zwei von 32 Karzinomen) und 13% (vier von 32 Karzinomen) waren MSI-H Karzinome.

Kim HS. et al.¹²⁵ fanden unter 41 Patienten mit Doppelkarzinomen (jeweils ein kolorektales Karzinom in Kombination mit einem Magenkarzinom (17 Patienten) oder extraintestinales Karzinom (24 Patienten)) vier Patienten mit metachronen Kolonkarzinomen, von welchen zwei Mikrosatelliten instabil waren. Brown et al.¹³¹ berichteten über eine MSI-Rate von 27% bei Doppelkarzinomen, von welchen jeweils eines ein kolorektales Karzinom in Kombination mit einem Karzinom aus dem HNPCC-Spektrum (28 kolorektale Karzinome, zwölf Magenkarzinome, 15 Ovarialkarzinome, 14 Uteruskarzinome – unter Ausschluss der HNPCC-Patienten) waren, im Gegensatz zu 8% bei einfachen Kolonkarzinomen. Die Arbeitsgruppe um Masubuchi S. et al. belegten eine signifikant höhere Frequenz von Mikrosatelliten instabilen Fällen bei Patienten mit metachronen Doppelkarzinomen als bei Patienten mit solitären Karzinomen (89% versus 14%).

Der Prozentsatz von Brown et al. (27% MSI) war unseren Zahlen somit sehr ähnlich, die 25% MSI-H Karzinome im Referenzpanel bei den metachronen Kolonkarzinomen ergaben.

Yamashita et al.¹³² analysierten 57 Karzinome, von welchen sechs synchrone Kolondoppelkarzinome waren: Sie erhielten einen Anteil von 17% MSI-H ($\geq 30\%$ der Marker instabil), 33% MSI-L und 50% MSS synchronen Kolonkarzinomen.

Dieser Prozentsatz stand im Einklang mit den Daten unserer synchronen Kolonkarzinome, die Instabilitätsraten von 13% MSI-H (versus 17% Yamashita et al.), sowie 87% MSS und MSI-L (versus 83% bei Yamashita et al.) in unserem Referenzpanel ermittelt hatten.

Demnach traten MSI-H Karzinome bei den meta- (25%, drei von zwölf Karzinomen) und synchronen (13%, vier der 32 Karzinomen) Doppelkarzinome auf, jedoch in einem deutlich geringerem Anteil als stabile oder niedrig instabile Doppelkarzinome erfasst wurden. Unsere hoch instabilen metachronen Kolonkarzinome wiesen alle den immunhistochemischen Expressionsverlust von hMLH1 auf, so dass man davon ausgehen kann, dass diese durch den Replication Error Pathway entstanden sind und sich somit die Tendenz zeigte, dass dieser Entstehungsmechanismus nicht zum überwiegenden Anteil Auslöser für syn- und metachrone Kolondoppelkarzinome sein muss.

(Zur Karzinogenese der Doppelkarzinome jeweils innerhalb einer Patientin im Vergleich siehe 5.4)

5.2.2 Chromosomale Instabilität bei Kolonkarzinomen

Der Karzinogenesemechanismus der chromosomalen Instabilität ist der häufigere Weg der Tumorentstehung und ist durch die sequentielle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. APC (Chromosom 5q) charakterisiert.

Das Auftreten von Loss of Heterozygosity wurde als Hinweis für den Verlust der Tumorsuppressoraktivität durch chromosomale Instabilität gewertet.

Bei 83% (zehn von zwölf metachronen Karzinome) war mindestens ein Loss of Heterozygosity auf dem Chromosom 5 nachweisbar, ebenso bei 81%, entsprechend 26 der 32 synchronen Kolonkarzinome. Darüber hinaus zeigte keines der Karzinome mit zahlreichen LOHs auf Chromosom 5 eine immunhistochemische Veränderung in der Expression der MMR-Gene.

Goel A. et al.¹³³ analysierten 209 sporadische Kolonkarzinome nach ihrer genomischen Instabilität. Hierbei erfassten sie 65% MSS, 21% MSI-L (Σ 86% MSS und L-MSI) und 14% MSI-H Karzinome. Insgesamt 51% ihrer Karzinome zeigten wenigstens einen LOH, wobei das Chromosom 5q mit D5S346 in 22% betroffen war. Zusätzlich konnten sie eine Überlappung von MSI und LOH bei einzelnen Karzinomen nachweisen: Von 107 ihrer LOH-Karzinome waren 6,6% MSI-H (65,4% MSS, 28% L-MSI) – und von 30 Karzinomen, welche MSI-H eingeordnet wurden, wiesen 23,3% einen oder mehrere LOHs auf. Außerdem fanden sie 37,8% Karzinome, welche MSS waren und keinen LOH beinhalten.

Im Vergleich zu Goel A. et al. (mit 51% LOHs) konnten wir auf dem Chromosom 5 mit 83% LOHs in unseren analysierten Loci bei den metachronen und 81% LOHs bei den synchronen Kolonkarzinomen höhere LOH-Raten belegen. Jedoch analysierten wir nur das Chromosom 5 und nicht auch noch die Chromosomen 18q, 17p und 3p, bei welchen Goel A. et al. z.T. auch deutlich höhere LOH-Raten (72,5% auf 18q) ermittelten.

Wie Goel A. et al. konnten auch wir eine Überlappung von instabilen Mikrosatelliten und Loss of Heterozygosity bei einzelnen Karzinomen erfassen: 30% der metachronen und 23% der synchronen Karzinome mit LOH wiesen mindestens zwei instabile Mikrosatellitenloci auf. Ebenfalls konnten wir MSI-H Karzinome mit gleichzeitigen

LOHs nachweisen: 33% der metachronen MSI-H Karzinome (mind. zwei instabile Mikrosatellitenmarker) beinhalteten auch LOHs; bei den synchronen MSI-Karzinomen waren bei allen Karzinomen zugleich LOHs aufgetreten. Außerdem fanden wir, wie Goel A. et al. (37,8%), bei 19% unserer synchronen Kolonkarzinome weder instabile Mikrosatelliten noch LOHs – jedoch muss einschränkend hinzugefügt werden, dass Goel A. et al. noch die Chromosomen 18q, 17p und 3p ergänzend ausgewertet haben, welche bei unserer Analyse nicht erfasst wurden, da wir statt dessen mehrere Loci des Chromosom 5 bearbeiten, so dass unsere Zahlen nicht exakt vergleichbar sind.

Die Arbeitsgruppe um Goel A. folgerte daraus, dass molekulare Mechanismen genomischer Instabilität nicht notwendigerweise unabhängig sein müssen und nicht vollständig durch den MSI- oder CIN-Mechanismus definiert werden. Vielmehr scheinen multiple Mechanismen in einem Karzinom existieren zu können, wenn eine solche Kombination zu einem Wachstumsvorteil führt.

Die Ähnlichkeit unserer Daten lässt dieselbe Schlussfolgerung auch für unsere Ergebnisse zu.

5.2.3 Mikrosatelliteninstabilität bei Magenkarzinomen

Bei den Magenkarzinomen waren im Referenzpanel 67% (acht von zwölf Karzinomen) stabil (MSS), die restlichen 33% (vier der zwölf Karzinome) hoch instabil (MSI-H). Auf Chromosom 5 waren 75% unserer zwölf Magendoppelkarzinome MSS (sieben der zwölf Karzinome, 58%) oder MSI-L (zwei der zwölf Karzinome, 17%), 25% (drei von 12 Karzinomen) waren MSI-H Karzinome.

Eine Mikrosatelliteninstabilität wurde bei 10% der *sporadisch auftretenden Magenkarzinome* von Kang GH et al.¹³⁴ beobachtet. Ähnliche Zahlen zeigten Kim et al.¹³⁵ bei Japanern (14,6%) und der kaukasischen Bevölkerung (8,5%). Hallinger et al. analysierten 117 Magenkarzinome und fanden 16% MSI-Karzinome, von welchen 47% MSI-L (<17% Loci instabil) und 53% MSI-H (>33% Loci instabil) klassifiziert wurden. Alle ihre hochinstabilen Karzinome beinhalteten einen Verlust an hMLH1(62,5%) oder hMSH2 (37,5%) – im Gegensatz zu den niedrig instabilen oder stabilen Karzinomen, die alle normale MMR-Protein-Muster darboten.

32,6% instabile Karzinome, die sich in 13,7% MSI-H und 18,9% MSI-L (ein oder zwei Marker) aufgliederten, ermittelte die Arbeitsgruppe um Fang DC. et al.¹³⁶ die 53 fortgeschrittene Magenkarzinome analysierte. Ihre MSI-H Karzinome (≥ 3 instabile

Loci) traten zu 25% bei intestinalen und zu 3,7% bei diffusen Karzinomen auf. Außerdem bot keiner ihrer MSI-H Karzinome einen LOH am APC-Locus. Chung Y.J. et al.¹³⁷ wiesen 30% instabile primäre Magenkarzinome nach, wovon 91% dem intestinalen Typ angehörten.

MSI-Analysen bei *Magenmehrfachkarzinomen* haben Miyoshi et al. durchgeführt: Sie wählten ein Patientenkollektiv von 78 Patienten, bei welchen in einem Beobachtungszeitraum von 1992-1999 zu 33% synchrone Mehrfachkarzinome und zu 18% metachrone Karzinome auftraten. Sie fanden MSI-L zu 8% bei Einzelkarzinomen, zu 27% bei synchronen und zu 43% bei metachronen Karzinomen und wiesen somit eine signifikant höhere Frequenz von MSI in Mehrfachkarzinomen gegenüber Einfachkarzinomen nach.

Nakashima H. et al.¹³⁸ publizierten in 78,5% MSI bei synchronen Magenmehrfachkarzinomen und in 20,8% bei solitären Magenkarzinomen. Darüber hinaus zeigten 72,7% ihrer Karzinome eine Heterogenität der Mikrosatellitenalterationen: Im selben Magen beinhaltete eines der Karzinome eine Mikrosatelliteninstabilität, das andere keine. Yamashita et al.¹³⁹ analysierten 57 Karzinome, von welchen fünf synchrone Magenmehrfachkarzinome waren: Sie beobachteten einen Anteil von 64% MSI-H ($\geq 30\%$ der Marker), 7% MSI-L und 29% MSS Magenkarzinome und somit ähnliche Zahlen wie Nakashima.

Die Daten unserer synchronen Magenkarzinome korrelierten am ehesten mit denen der Arbeitsgruppe von Miyoshi: Wir erzielten in unserem Referenzpanel einen Prozentsatz von 33% MSI-H Karzinome versus 27% bei Miyoshi et al. Das heißt Nakashima und Yamashita belegten mit 78,5% und 64% deutlich höhere Anteile an Mikrosatelliten instabilen Karzinomen.

Die Heterogenität der Mikrosatelliteninstabilität, wie sie Nakashima et al. in 72,7% ihrer Karzinome beschrieben hatten, zeigte sich auch bei 75% unserer Patientinnen mit instabilen Mikrosatelliten.

Wir ermittelten einen deutlich höheren Teil an Mikrosatelliteninstabilitäten als er bei sporadischen Karzinomen gewöhnlich nachgewiesen wird: 33% MSI-H synchrone Karzinome dieser Arbeit versus 8%-20% bei solitären Karzinomen. Somit scheinen unsere Doppelkarzinome über den Replication Error Pathway zu entstehen.

(Vergleich der Doppelkarzinome innerhalb einer Patientin siehe unter 5.4).

Der *Tumortyp nach Laurén* stellt einen wichtigen histologischen und prognostischen Parameter bei den Magenkarzinomen dar:

Die analysierte Gruppe der Magenkarzinome dieser Arbeit setzte sich aus zwölf Karzinomen von sechs Patientinnen zusammen. Eine Patientin hatte zwei Karzinome vom diffusen Typ, alle anderen Patientinnen nur Karzinome vom intestinalen Typ. Die Karzinome vom diffusen Typ waren Mikrosatelliten stabil (MSS), ebenso wie fünf Karzinome von fünf weiteren Patientin mit intestinalem Typ. Von acht Karzinomen von vier Patientinnen mit intestinalen Karzinomen boten fünf Karzinome Mikrosatelliteninstabilitäten (darunter vier MSI-H Karzinome).

Ähnliche Ergebnisse ermittelten die folgenden Studien: Die Arbeitsgruppe um Strickler et. al.¹⁴⁰ konnte ebenfalls bei keinem diffusen Typ MSI nachweisen. Bei Dos Santos et al.¹⁴¹ waren alle MSI-Karzinome vom intestinalen Typ, keines gehörte dem diffusen Typ nach Laurén an. Auch bei Kang et al. waren Mikrosatelliten instabile Karzinome überwiegend vom intestinalen Typ (statistisch jedoch nicht signifikant).

Keller et al.¹⁴² und Lin et. al.¹⁴³ konnten dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen intestinalem und diffusen Typ sehen.

Der Entstehungsmechanismus über die Mikrosatelliteninstabilität scheint den Karzinomtyp zu beeinflussen: Der pathohistologische Karzinomtyp und die Genetik korrelierten in soweit miteinander, dass Karzinome des diffusen Typs überwiegend Mikrosatelliten stabil und Karzinome des intestinalen Typs bevorzugt Mikrosatelliten instabil waren.

5.2.4 Chromosomale Instabilität bei Magenkarzinomen

LOH trat bei 50% der zwölf synchronen Magendoppelkarzinome in den ausgewerteten Primern des Chromosom 5 auf.

Ohmura K. et al.¹⁴⁴ analysierten 61 Magenkarzinome, von welchen 42% *LOHs* an mindestens einem Chromosomenarm aufwiesen. Bae I.S.¹⁴⁵ forschten nach genetischen Veränderungen in Magenkarzinomzelllinien und deren Originalgewebe und ermittelten LOH bei Adenokarzinomen auf dem Chromosom 5q in 59%.

Wir erfassten somit eine ähnliche Rate an LOHs bei unseren Magenkarzinomen mit 50% wie Ohmura (42%) und Bae (59%).

Kimura T. et al.¹⁴⁶ untersuchten 25 Karzinome hinsichtlich LOH, die sie zu 16% am APC-Locus nachweisen konnten. Stadtländer et al.¹⁴⁷ beobachteten LOH im APC-

Locus bevorzugt bei Karzinomen vom intestinalen Typ – im Gegensatz zu Chung et al.¹⁴⁸, sowie Choi et al.¹⁴⁹, die keine Korrelation zwischen LOH des APC-Locus und dem histologischem Phänotyp herstellen konnten.

In dieser Arbeit traten im Referenzpanel in 17% LOHs in 5q21-22 auf, insgesamt 27% LOHs traten in weiteren APC assoziierten Primern des Chromosoms 5 auf. Diese Zahl korrelierte mit den Ergebnissen von Kimura T. et al. Des Weiteren waren diese Karzinome mit LOH, wie bei Stadtländer, Karzinome vom intestinalen Typ.

Die Karzinogenese durch chromosomale Instabilität mit Loss of Heterozygosity scheint somit nicht nur bei den Kolonkarzinomen der Adenom-Karzinom-Sequenz zu folgen, sondern auch bei einem Teil unserer Magenkarzinome Auslöser für die Entwicklung von Karzinomen zu sein.

Goel et al. konnte (ebenso wie wir bei unseren analysierten Kolonkarzinomen – siehe hierzu 5.2.2), bei 107 seiner 209 analysierten sporadischen Kolonkarzinome eine Überlappung von MSI und LOH nachweisen. Von 30 (6,6%) ihrer MSI-H Karzinome wiesen wiederum 23,3% einen oder mehrere LOHs auf.

25% (eins von vier) unserer synchronen MSI-H Magenkarzinome wies im Referenzpanel gleichzeitig LOH auf (APC-Locus des Referenzpanels, außerdem sechs weitere LOHs der weiteren Primer des Chromosom 5).

Somit scheint die Überlappung von MSI und LOH nicht nur bei Kolon- sondern auch bei Magenkarzinomen aufzutreten, so dass auch bei den Magenkarzinomen die molekularen Mechanismen genomischer Instabilität nicht notwendigerweise unabhängig sein müssen und nicht vollständig durch den MSI- oder CIN-Mechanismus definiert werden.

5.2.5 MSI-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosom 5 und 5q21-q22 (APC-Primer, Referenzpanel, Chromosom 5)

In den folgenden beiden Gliederungspunkten (5.2.5 und 5.2.6) wird verglichen, ob bei Auftreten einer Alteration im Referenzpanel auf Chromosom 5 (APC-Primer, 5q21-q22) zusätzliche Veränderungen in den weiteren neu etablierten Primer des Chromosom 5 nachweisbar waren.

Drei der zwölf *metachronen Kolonkarzinome* zeigten auf Chromosom 5 eine Instabilität des APC-Locus 5q21-q22 und waren in weiteren analysierten Primern des Chromosoms

5 Mikrosatelliten instabil. Zugleich war bei allen drei Karzinomen ein Verlust der Expression von hMLH1 nachweisbar. Die Karzinogenese dieser Karzinome könnte daher am ehesten auf den Replication Error Pathway zurückgeführt werden.

Darüber hinaus waren sieben weitere metachrone Karzinome von vier Patientinnen in Primern des Chromosoms 5 instabil, ohne dass diese in 5q21-q22 (APC) instabil waren. Allerdings waren auf dem Chromosom 5 fünfmal nur ein Primer und einmal zwei Primer innerhalb eines Karzinoms instabil, das heißt weniger als 18% der analysierten Loci, so dass diese Instabilitäten auch durch ein sporadisches Ereignis, im Sinne einer permanenten Hintergrundinstabilität, entstanden sein könnten¹⁵⁰. Diese Annahme wurde durch das Fehlen eines MMR-Expressionsverlustes verstärkt.

Nur bei einem Karzinom waren drei Primer (27%) instabil, auch lag keine MMR-Mutation vor, statt dessen traten LOHs in 5q21-q22 und in weiteren drei Primern des Chromosoms 5 auf, so dass die Entstehung dieses Karzinoms auf den Tumor Suppressor Pathway zurückgeführt werden könnte, wofür auch seine distale Lokalisation sprechen würde.

Alle *synchronen Dickdarmkarzinome* hatten auf Chromosom 5 in 5q21-q22, APC-Locus, stabile Mikrosatelliten.

Neun synchrone Kolonkarzinome beinhalteten dagegen instabile Mikrosatelliten in den weiteren auf Chromosom 5 analysierten Primern dieser Arbeit. Es waren jedoch wiederum nur maximal 18% der analysierten Loci instabil. Diese Instabilität könnte somit ebenfalls durch sporadische Hintergrundmutationen erklärbar sein, zumal keine MMR-Expressionsverluste vorlagen. Die Karzinome schienen also eher durch chromosomale Instabilität ausgelöst worden zu sein.

Die Karzinome einer Patientin könnten aber auf Grund ihrer Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H Karzinome) und ihrer proximalen Lage auch dem Replication Error Pathway zugeordnet werden, jedoch fehlten in unseren analysierten MMR-Genen die zu erwartenden immunhistochemischen Expressionsveränderungen.

Eine Mikrosatelliteninstabilität in 5q21-q22 (APC-Locus) trat bei vier *synchronen Karzinomen des Magens* auf. Diese Karzinome boten darüber hinaus weiter instabile Mikrosatellitenloci auf Chromosom 5. Drei dieser Karzinome beinhalteten außerdem eine fehlende Expression von hMLH1. Dem vierten Karzinom fehlte diese Alteration der Expression. Es schien aber dennoch aufgrund seiner instabilen Mikrosatelliten

(MSI-H Karzinom), ebenso wie die anderen drei Karzinome (ebenfalls MSI-H), auch durch den Replication Error Pathway verursacht worden zu sein.

Darüber hinaus zeigte ein weiteres Karzinom auf Chromosom 5 einen instabilen Mikrosatellitenlocus in 5q14-q21. Es war jedoch nur ein Primer betroffen (9%). Diese Mikrosatellitenalteration könnte daher wiederum sporadisch aufgetreten sein.

5.2.6 LOH-Unterschiede zwischen den Primern des Chromosoms 5 und 5q21-q22 (APC-Primer, Referenzpanel, Chromosom 5)

Sechs *metachrone Kolonkarzinome* zeigten einen LOH des APC-Locus 5q21-q22 und auch LOHs in weiteren Primern des Chromosoms 5. Diese LOHs, sowie die überwiegende distale Lokalisation der Karzinome und das Fehlen von Mismatch-Repair-Gen-Verlusten, ließen die Annahme zu, dass die Karzinome durch den Tumor-Suppressor-Pathway entstanden sein könnten.

Darüber hinaus beinhalteten drei weitere Karzinome in einem oder zwei Primern des Chromosoms 5 LOHs – ohne einen gleichzeitigen LOH im APC-Locus 5q21-q22 des Referenzpanels vorzuweisen. Da diese LOHs aber weniger als 18% aller analysierten Primer des Chromosom 5 betrafen, könnte es sich auch um ein sporadisches Ereignis im Sinne einer permanenten Hintergrundinstabilität handeln.

Ein weiteres Karzinom bot drei LOHs in den neu etablierten Primern des Chromosom 5, aber keinen LOH in 5q21-q22 (APC, Referenzpanel). Vielmehr hatte es sowohl im Referenzpanel als auch auf Chromosom 5 instabile Mikrosatelliten (MSI-H) und zeigte einen Expressionsverlust von hMLH1, so dass die Genese dieses Karzinoms eher durch Replication Error ausgelöst worden zu sein schien.

Zwölf *synchrone Dickdarmkarzinome* boten einen LOH in 5q21-q22 (APC-Locus) und zeigten zudem LOHs in weiteren Primern des Chromosoms 5. Dies und ihre distale Lokalisation, sowie das Fehlen von Veränderungen an den MMR-Genen, wies auf den Tumor Suppressor Pathway als Entstehungsweg hin.

Vierzehn weitere *synchrone Kolonkarzinome* beinhalteten LOHs auf Chromosom 5, ohne dabei in 5q21-q22 einen LOH zu zeigen. Des Weiteren wiesen sie keine MMR-Veränderungen auf, so dass ihre Entstehung nicht durch den Replication Error Pathway ausgelöst worden zu sein schien.

LOH im APC-Locus (5q21-q22) boten zwei *synchrone Karzinome des Magens* und wiesen auf Chromosom 5 weitere LOHs auf. Eines dieser Karzinome zeigte zudem instabile Mikrosatelliten (MSI-H) im Referenzpanel und in weiteren Primern des Chromosom 5, sowie einen Verlust von hMLH1, so dass die Entstehung dieses Karzinoms den Replication Error Pathway zu gehen schien. Das andere Karzinom war dagegen eher durch den Tumor Suppressor Pathway ausgelöst worden. Da diese beiden Karzinome bei einer Patientin auftraten, würde das bedeuten, dass sich verschiedene Karzinome eines Patienten nicht immer auf die gleiche Weise entwickeln müssen.

Darüber hinaus zeigten vier weitere Karzinome LOHs in den neu etablierten Primern des Chromosom 5, im APC-Locus (5q21-q22) des Referenzpanels beinhalteten diese jedoch keine LOHs. Drei dieser LOHs auf Chromosom 5 waren bei Patientinnen nachweisbar, deren Karzinome (MSI-H) dem Replication Error Pathway zu folgen schienen und waren wahrscheinlich durch die permanente Hintergrundinstabilität verursacht worden. Das vierte dieser Karzinome beinhaltete nur die drei LOHs auf Chromosom 5 und wurde somit wahrscheinlich durch chromosomale Instabilität ausgelöst.

5.3 Bethesda Kriterien bei synchronen und metachronen Kolonkarzinomen

Der Zusammenhang zwischen sporadischen und hereditären Kolonkarzinomen mit dem MSI-Phänotypus wurde schon in früheren Studien erforscht. Sie ergaben eine Assoziation der instabilen Karzinome, unabhängig davon, ob sie im Rahmen des HNPCC-Syndroms oder sporadisch auftraten, mit einer Lokalisation im proximalen Kolon und einem wenig differenzierten Bild, sowie einer stärkeren Muzinproduktion, günstigeren Prognose und einem niedrigeren Durchschnittsalter der Betroffenen^{21, 94}.

Das zweite Bethesda-Kriterium erfasst syn- oder metachronen Karzinome in HNPCC typischer Lokalisation – wie sie in dieser Arbeit analysiert wurden – und klassifiziert die betroffenen Patienten als HNPCC-Risikogruppe.

Dies würde bedeuten, dass diese Karzinome durch Replication Error entstehen und Mikrosatelliteninstabilität aufweisen.

Im Folgenden werden unsere syn- und metachronen Kolonkarzinome unter diesem Aspekt überprüft, um zu sehen, ob die Zuordnung für alle unsere Patientinnen mit

Kolonkarzinomen zur HNPCC-Gruppe mit RER-Entstehungsweg und MSI zutreffend ist.

Zusammenfassung: HNPCC - Definition, Klinik und Molekulargenetik:

Multiple Karzinome wachsen bei 5-10%^{151, 152} der Patienten mit „gewöhnlichen“ Darmkarzinomen und in 11,5-24%^{153, 154} der HNPCC-Patienten, wobei über 90%⁸⁵ der HNPCC-Karzinome und lediglich 15%^{86, 117} der sporadischen Karzinome den MSI-Phänotypus inne haben. 85% MSI bei HNPCC- versus 17% MSI bei sporadischen Karzinomen erfasste auch die Gruppe um Pedroni M et. al.¹⁵⁵.

Die höhere MSI-Frequenz in HNPCC-Karzinomen (>90%) als in sporadischen singulären Karzinomen (8,1%-15%) – selbst als in Doppelkarzinomen (17%-27,4%) – deutete an, dass die Beteiligung von MMR-Genen in der Pathogenese von sporadischen Karzinomen ungewöhnlicher ist.

Bei der Analyse von 32 Karzinomen von 15 Patientinnen mit *synchronen Dickdarmkarzinomen* in dieser Arbeit erwiesen sich 81% (26 von 32 Karzinomen) als Mikrosatelliten stabil (MSS). 6% (zwei von 32 Karzinomen) waren niedrig instabil (MSI-L) und 13% (vier von 32 Karzinomen) gehörten den hoch instabilen (MSI-H) Karzinomen an. Das heißt, mit insgesamt 19% Mikrosatelliten instabilen Karzinomen mit einem Anteil von 13% hoch instabilen Karzinomen (MSI-H), unterschieden sich die synchronen Karzinome dieser Arbeit von den HNPCC-Karzinomen, die zu >90% MSI-H klassifiziert werden. Sie passten vielmehr zur MSI-Frequenz von Doppelkarzinomen (17%-27,4%) und ähnelten derer der Gruppe der sporadischen Karzinome, die zu 8,1-15%^{86, 117} bzw. zu 17% als MSI Karzinome eingeordnet werden.

Bei der Auswertung von zwölf *metachronen Kolonkarzinomen* von sechs Patientinnen waren 75% (neun von zwölf Karzinomen) Mikrosatelliten stabil (MSS). 25% (drei der zwölf Karzinome) waren MSI-H Karzinomen. Bei diesen hoch instabilen Karzinomen war zudem ein Expressionsverlust von hMLH1 aufgetreten.

Zu berücksichtigen ist, dass Mikrosatelliteninstabilität bei HNPCC-Patienten in Folge von Keimbahnmutationen der MMR-Gene auftritt, auf welche wir bei unauffälliger Immunhistologie (kein Expressionsverlust in hMLH1, hMSH2, hMSH6) bei den synchronen Kolonkarzinomen keinen Hinweis hatten. Das Auftreten von instabilen Mikrosatelliten schien bei diesen Karzinomen mit instabilen Mikrosatellitenloci überwiegend durch die permanente Hintergrundinstabilität ausgelöst worden zu sein und konnte deshalb keinen so hohen Prozentwerte erzielen wie in Karzinomen mit

defekten Repairgenen – im Gegensatz zu den metachronen Kolonkarzinomen, die bei ihren drei hoch instabilen Karzinomen einen Verlust der Expression von hMLH1 und einen entsprechend höheren Wert an instabilen Mikrosatelliten aufwiesen.

70-90% aller HNPCC-Patienten beherbergen *Keimbahnmutationen* in einem der klonierten DNA-Reparaturgene (hMSH2, hMLH1). Lediglich 25% der Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen in unserem Patientengut wiesen MMR-Expressionsverluste auf, die auf eine derartige Keimbahnmutation hinweisen. Keine der Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen zeigte Veränderungen der MMR-Gene, so dass nicht alle unsere Patientinnen in die HNPCC-Gruppe eingeordnet, und ihre Karzinome als wahrscheinlich nicht im Rahmen von HNPCC vererbt angesehen werden können, auch wenn sie das zweite Bethesda-Kriterium erfüllen.

Unsere Patientenkollektiv im allgemeinen, die immunhistochemische Analyse der Reparaturgene und die Mikrosatelliteninstabilitäts-Untersuchungen führte zu einer genaueren Auswertung der Bethesda-Kriterien, gemäß derer eine vererbte Störung als Wahrscheinlich angesehen wird, wenn ein oder mehrere Punkte dieser Merkmale¹⁵⁶ zutreffen – andernfalls werden die aufgetretenen Karzinome als „sporadische Karzinome“ klassifiziert.

Im Folgenden werden Übereinstimmungen und Abweichungen mit den Unterpunkten der entsprechenden Bethesda-Kriterien (Kriterien siehe 1.2.1) diskutiert:

Ad 2. Alle fünfzehn Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen und alle sechs Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen erfüllten dieses Kriterium.

Ad 4. Bei einer Patientin wurden bereits mit 41 Jahren die synchronen Karzinome diagnostiziert.

Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen lag zum Operationszeitpunkt bei 73 Jahren. Bei den Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen betrug das Durchschnittsalter bei der Operation des Erstkarzinoms 69,5 Jahre, bei der Operation des Zweitkarzinoms 72 Jahre. Diese Patientinnen waren somit in die Altersspanne der sporadischen Karzinome einzuordnen.

Ad 5. Die synchronen Karzinome wuchsen zu 56% (18 von 32 Karzinomen) im distalen Abschnitt des Kolon. Nur 44% (14 von 32 Karzinomen) unserer analysierten synchronen Kolonkarzinome wurden proximal bis zur linken Flexur

aufgefunden, im Gegensatz zu HNPCC-Patienten, deren Karzinome zu 70% proximal verteilt sind. Metachrone Kolonkarzinome waren zu 42% (fünf der zwölf Karzinome) distal und zu 58% (sieben von zwölf Karzinomen) proximal lokalisiert und hatten somit eine Lage, die sich der Karzinomlokalisierung der HNPCC-Patienten annäherte.

Es traf somit für alle unsere analysierten syn- und metachronen Kolonkarzinome das zweite Bethesda-Kriterium zu – einige Karzinome erfüllten sogar noch weitere Kriterien. Dies würde bedeuten, dass die Patientinnen der HNPCC-Risikogruppe zugeordnet würden, und somit ihre Karzinome aufgrund einer Keimbahnmutation in den DNA-Reparaturgenen auch durch den HNPCC-typischen Replication Error Pathway ausgelöst werden könnten. Nicht alle unsere Karzinome zeigten jedoch einen Verlust der Expression in den MMR-Genen. Insgesamt erfüllten den RER Pathway von den insgesamt 44 Kolonkarzinomen wahrscheinlich (für eine sichere Aussage muss die Keimbahnmutation nachgewiesen werden) nur drei Karzinome (7% im Ganzen, 25% der metachronen Karzinome, keines der synchronen Kolonkarzinome), so dass die Zuordnung aller ausgewerteten syn- und metachronen Karzinome dieser Arbeit in die HNPCC-Patientengruppe nicht korrekt wäre. Gleichzeitig würde das heißen, dass auch sporadische Doppelkarzinome durch den Replication Error Pathway hervorgerufen werden können.

(Zum Karzinomvergleich innerhalb einer Patientin siehe 5.4).

5.4 Unterschiedliche Wege bei der Karzinomentstehung

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist, durch eine aufeinander folgende Akkumulation von genomischen Defekten, ein Beispiel für die sequentielle Karzinomentwicklung. Obwohl diese Sequenz gut erforscht ist, gibt es wenige Studien, welche die Genetik unterschiedlicher Karzinome eines Patienten/einer Patientin vergleichen.

In dieser Arbeit wurden syn- und metachron aufgetretene Karzinome bei Patientinnen verglichen, um genetische Alterationen in verschiedenen Läsionen der Patientinnen zu analysieren. Alle Karzinome eines Organismus waren den gleichen Bedingungen ausgesetzt, zeigten aber nicht immer dasselbe genetische Muster:

Bei den *metachronen Kolonkarzinomen* konnte die Karzinomentstehung von vier Patientinnen auf den Tumor Suppressor Pathway/chromosomale Instabilität und von

einer Patientin auf den Replication Error Pathway/Mikrosatelliteninstabilität zurückgeführt werden. Auffälliger Weise differierten zwei Karzinome einer Patientin in ihrer Genese: Ein Karzinom war durch den Tumor Suppressor Pathway, das andere durch den Replication Error Pathway verursacht worden. Dies deutete auf eine unabhängige und simultane Karzinogenese hin.

Aus der Gruppe der *synchronen Kolonkarzinome* wurden die Karzinome von vier Patientinnen wahrscheinlich durch chromosomale Instabilität hervorgerufen, zehn Patientinnen entwickelten ihre Karzinome als Folge des Tumor Suppressor Pathways. Der Replication Error Pathway könnte für die Karzinomentstehung einer Patientin verantwortlich sein, deren Karzinome die entsprechende Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H), jedoch keine Expressionsverluste der drei analysierten MMR-Gene zeigten.

Unter den ausgewerteten *Magenkarzinomen* hat die chromosomale Instabilität die Karzinomentstehung bei drei Patientinnen begünstigt. Zwei Patientinnen erkrankten an je zwei Karzinomen, die in ihrer Genese differierten: Jeweils eines folgte dem Tumor Suppressor Pathway, jeweils das andere dem Replication Error Pathway, was eine unabhängige Karzinogenese andeutet. Ein Karzinom einer weiteren Patientin wurde auch durch den Replication Error Pathway verursacht, das andere Karzinom zeigte ebenso instabile Mikrosatelliten (MSI-H Karzinom), aber keine Expressionsveränderung der analysierten MMR-Gene – es schien jedoch ebenfalls durch den Replication Error Pathway ausgelöst worden zu sein.

Außerdem ließ sich folgern, dass gleiches Grading und Staging nicht immer die selbe Immunhistochemie implizieren mussten, denn drei Patientinnen beherbergten verschiedene genetische Instabilitäten in differenten, synchron aufgetretenen Magenkarzinomen, was man als nicht-klonales Wachstum unter den selben Umweltvoraussetzungen deuten könnte oder aber als Beschreitung des Replication Error Pathways von jeweils nur einem der beiden Karzinome der drei Patientinnen.

Des Weiteren zeigte sich, dass Doppelkarzinome nicht immer im selben Wachstumsstadium klinisch manifest wurden.

Ähnliche Resultate ermittelten Sedivy B. et al.¹⁵⁷, die Karzinome, Adenome und abweichende Krypten Foci bei sechs Patienten mit sporadischen Kolontumoren erforschten. In Übereinstimmung mit der Adenom-Karzinom-Sequenz spiegelten vier ihrer Patienten eine Anhäufung genetischer Defekte in synchron aufgetretenen Karzinomen während der Karzinogenese wieder. Aber zwei Patienten mit nicht-erblichen Karzinomen wiesen unterschiedliche genetische Instabilitäten in

verschiedenen, aber synchron aufgetretenen Karzinomen auf, was Sedivy et al. als nicht-klonales Wachstum unter beinahe gleichen Umweltbedingungen implizierten. Sie leiteten daraus ab, dass sporadisch auftretende Läsionen des Kolon nicht notwendiger Weise vom selben genetischen Mechanismus verursacht werden müssen. Des Weiteren folgerten sie, dass prämaligne Vorstufen, welche von unterschiedlichen genetischen Instabilitäten ausgehen, in Karzinome übergehen können, was eine unabhängige und simultane Karzinogenese im selben Organ anzeigt.

Die Ergebnisse jener Arbeitsgruppe waren mit den Daten dieser Arbeit vergleichbar, so dass sich die Resultate von Sedivy et al. auch in unseren Schlussfolgerungen widerspiegeln:

Die Karzinome wurden nicht alle durch den gleichen Mechanismus verursacht: Sie folgten zum einen dem Replication Error Pathway und zum anderen dem Tumor Suppressor Pathway bei ihrer Entstehung. Diese unterschiedlichen auslösenden Grundlagen konnten auch bei den verschiedenen Karzinomen jeweils einer Patientin die Karzinogenese veranlassen. Es bestand somit eine unabhängige und simultane Karzinogenese. Der karzinogene Prozess konnte also selbst in derselben Mikroumwelt und bei gleichem genetischen Hintergrund verschiedenen Wegen der Karzinomentwicklung folgen.

Andererseits konnte Mikrosatelliteninstabilität aber auch ein zufälliger Prozess sein, der die individuelle Klonalität – im Sinne einer permanenten Hintergrundinstabilität – des jeweiligen Karzinoms widerspiegelte.

5.5 Möglichkeiten für die gastroenterologische Onkologie

In Zusammenschau unserer Ergebnisse aus der Mikrosatelliten- und LOH-Analyse der Primer des Chromosom 5 zeigte sich, dass einige Primer bevorzugt bei metachronen oder synchronen Kolonkarzinomen instabil waren. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, diese Primer an einem größeren Kollektiv aus meta- und synchronen Kolonkarzinomen erneut zu analysieren, um zu ermitteln, ob sich diese Unterschiede bestätigen. Somit hätte man bei resezierten Karzinomen eine Möglichkeit zu sehen, ob ein metachrones Zweitkarzinom zu erwarten ist.

Ein ähnlicher Vergleich könnte auch zwischen syn- und metachronen Magenkarzinomen angestrebt werden, da sich auch in der kleinen Gruppe unserer

synchronen Magenkarzinome bereits Genabschnitte auf dem Chromosom 5 hervorgehoben haben, welche bevorzugt instabile Mikrosatelliten oder LOH enthielten.

Interessante Regionen für den *Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität* bei Kolondoppelkarzinomen sind 5q11.2-12.1 (D5S586) und 5q13.1-14.1 (D5S1464, D5S1472), sowie der Primer D5S209 mit dem umfassenden Genabschnitt von 5q13.1-33.3, sowie D5S1720 für den Abschnitt 5q21.3-22.1. Wobei die Primer D5S1720, D5S1464, D5S586 und D5S209 als Differenzierungskriterien zwischen syn- und metachronen Kolondoppelkarzinomen angesehen werden könnten.

Bei den synchronen Magenkarzinomen waren die Genregionen um 5q12.3-13.2, sowie der Abschnitt von 5q14-21 bevorzugt Mikrosatelliten instabil, so dass für weitere Analysen auf die Primer D5S1464, D5S1404 und D5S82 zurückgegriffen werden könnte.

Ähnliches gilt für den *LOH-Nachweis* im Vergleich der Karzinomgruppen, da sich auch bei dieser Analyse bevorzugt betroffene Genabschnitte abgezeichnet haben. Auch diese Hinweise müssten an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt oder widerlegt werden, würden aber dann weitere diagnostische Optionen eröffnen.

Für die LOH-Analyse interessante Genabschnitte auf Chromosom 5 sind für Kolondoppelkarzinome die Region 5q13.2-14.3 und somit die Primer D5S1459, D5S806, D5S1472 und D5S1467. Als Unterscheidungshinweis zwischen syn- und metachronen Kolonkarzinomen könnten hierbei die Primer D5S1459 und D5S1720 dienen.

Bei den synchronen Magenkarzinomen könnte man mit den Primern D5S1464, D5S1472, D5S1459 und D5S806 die überwiegend von LOH betroffenen Genabschnitte von 5q13.1-14.1 auf dem Chromosom 5 erfassen.

Kolonkarzinome		Magenkarzinome	
LOH-Primer/Loci	MSI-Primer/Loci	LOH-Primer/Loci	MSI-Primer/Loci
<i>D5S1459/5q13.3</i>		D5S1459/5q13.3	
D5S806/5q13.2		D5S806/5q13.2	
D5S1467/5q14.1-14.3		D5S1472/5q13.3-14.1	
D5S1472/5q13.3-14.1		D5S1464/5q13.1-13.2	
<i>D5S1720/5q21.3-22.1</i>			D5S1404/5q12.3-13.1
	<i>D5S586/5q11.2-12.1</i>		D5S82/5q14-21
	<i>D5S1464/5q13.1-13.2</i>		
	<i>D5S209/5q13.1-33.3</i>		

Tabelle 50: Primer und deren Loci zur weiteren Analyse an einem größeren Patientenkollektiv
(kursiv: auffällige Unterschiede der Instabilität bei metachronen und synchronen Kolonkarzinomen)

Tabelle 50 listet mögliche interessante Primer und deren Loci zur weiteren Bestimmung bei einem größeren Patientenkollektiv auf. Kursiv sind alle Primer der Kolonkarzinome markiert, die eine unterschiedliche Instabilität zwischen synchronen und metachronen Kolonkarzinomen in dieser Arbeit aufwiesen und daher als mögliche prädiktive Marker angesehen werden könnten, sollte sich dieser Unterschied auch bei einem größeren Patientenkollektiv bestätigen.

Die Molekulargenetik eröffnet somit viele neue Möglichkeiten. Weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet werden in den nächsten Jahren sicherlich zu einem enormen Wissenszuwachs führen, welcher hoffentlich auch zu einer Verbesserung der Lebensqualität und einer Überlebenszeitverlängerung der Patienten führen wird.

VI. Zusammenfassung

Die Instabilität von Mikrosatelliten (MSI) wurde als ein möglicher Schritt der Karzinogenese (Replication Error Pathway) von gastrointestinalen Karzinomen beschrieben. Hierbei handelt es sich um kurze repetitive DNA-Sequenzen, deren Länge im Tumorzellgenom durch Mutationen, die durch Insertion oder Deletion von Basenpaaren zustande kommen, variiert. Ein anderer Weg der Tumorentstehung erfolgt über die chromosomale Instabilität (CIN), den Tumor Suppressor Pathway.

Die Untersuchung erfasste sechs Patientinnen mit zwölf metachronen und 15 Patientinnen mit 32 synchronen Dickdarmkarzinomen, des Weiteren zwölf synchrone Magenkarzinome von sechs Patientinnen. Bei diesen 27 Patientinnen wurden Karzinomgewebe und korrespondierendes Normalgewebe auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Loss of Heterozygosity (LOH) evaluiert.

Die DNA für die molekularbiologische Untersuchung der Mikrosatellitenloci wurde durch Mikrodisektion und Proteinase-K-Verdau aus Paraffinblöcken gewonnen. Daran anschließend erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion eine Amplifikation der Ausgangs-DNA für die MSI- und LOH-Analyse. Hierfür dienten das Referenzpanel mit den Primern BAT25, BAT26, APC, Mfd 15CA, D2S123 und elf weitere Primer des Chromosoms 5 (Loci: 5q12.1-12.3, 5q13.1-13.2, 5q13.3-14.1, 5q14.1-14.3, 5q13.3, 5q12.3-13.1, 5q13.2, 5q11.2-12.1, 5q13.1-33.3, 5q21.3-22.1, 5q14-21) als Marker.

Bei der genetischen Analyse der untersuchten Karzinome waren im Referenzpanel drei von zwölf metachronen Kolonkarzinomen (25%), vier von 32 synchronen Dickdarmkarzinomen (13%) und vier der zwölf synchronen Magenkarzinome (33%) Mikrosatelliten hoch-instabil (MSI-H). Zwei von 32 synchronen Dickdarmkarzinomen (6%) waren zudem niedrig-instabil (MSI-L).

Bei den metachronen Dickdarmkarzinomen verteilten sich die instabilen Mikrosatelliten jeweils dreimal auf die Primer BAT25, BAT26, APC und zweimal auf D2S123, bei den synchronen Dickdarmkarzinomen je viermal auf BAT26 und D17S250, sowie je einmal auf BAT25 und D2S123, bei den Magenkarzinomen je viermal auf BAT26 und APC, jeweils zweimal auf BAT25, D17S250 und D2S123.

Bei der Analyse der Primer auf Chromosom 5 zeigten zehn von zwölf metachronen Kolonkarzinomen (83%) instabile Mikrosatelliten, wobei die Primer/Loci D5S1464/5q13.1-13.2, D5S1472/5q13.3-14.1, D5S209/5q13.1-33.3 und

D5S1720/5q21.3-22.1 die häufigsten Veränderungen aufwiesen. Somit waren die häufigsten Mikrosatelliteninstabilitäten in den Regionen des APC-Gens, in RASq21 und in der Region von JMY aufgetreten. Neun der 32 synchronen Dickdarmkarzinome (28%) boten auf Chromosom 5 instabile Mikrosatellitenloci, wobei D5S1472/5q13.3-14.1 und D5S209/5q13.1-33.3 führten, und somit ebenso Instabilitäten im Bereich von RASq21 und im Abschnitt 5q13.1-33.3 auftraten. Magenkarzinome beinhalteten zu 42% (fünf von zwölf Karzinomen) auf Chromosom 5 instabile Mikrosatellitenloci, die vor allem mittels D5S82/5q14-21, D5S1464/5q13.1-13.2 und D5S1404/5q12.3-13.1 erfasst wurden. Hier waren der APC-Bereich und der Abschnitt von JMY betroffen.

Sechs der zwölf metachronen Kolonkarzinome (50%) wiesen im Referenzpanel Loss of Heterozygosity (LOH) auf, der sechsmal den APC Locus betraf und einmal D17S250. Bei 83% (zehn von zwölf Karzinomen) traten weitere LOHs auf Chromosom 5 auf: Diese waren besonders bei D5S1472/5q13.3-14.1, D5S1467/5q14.1-14.3, D5S806/5q13.2 nachweisbar und zudem bei D5S1459/5q13.3. Somit waren häufige LOHs in den Bereichen 5q13.2-14.3 incl. JMY und RASq21, sowie in der APC-Region zu finden.

Bei den synchronen Dickdarmkarzinomen boten 38% (zwölf von 32 Karzinomen) LOHs, die zwölfmal dem APC-Primer zuzuordnen waren oder bei D2S123 (zweimal) und D17S250 (einmal) auftraten. 81% (26 von 32 Karzinomen) dieser Gruppe beinhaltete auf Chromosom 5 weitere LOHs, wobei D5S806/5q13.2 und D5S1720/5q21.3-22.1 am häufigsten betroffen waren. Es war somit der Bereich von JMY und APC betroffen.

Nur bei zwei der zwölf Magenkarzinome (17%) waren LOHs im Referenzpanel ersichtlich, die dann ausschließlich im APC-Locus nachzuweisen waren. Auf Chromosom 5 zeigten sich bei sechs der zwölf Karzinome (50%) weitere LOHs, die überwiegend bei D5S1459/5q13.3, gefolgt von D5S1464/5q13.1-13.2, D5S1472/5q13.3-14.1 und D5S806/5q13.2 auftraten. In dieser Gruppe waren somit LOHs häufig von 5q13.1-14.1 (Region von JMY, RASq21) und in der APC-Region lokalisiert.

Die Karzinomlokalisierung und die genetische Instabilität korrelierten folgendermaßen:

Drei der zwölf metachronen Kolonkarzinome (25%) traten im Colon transversum auf, zwei von zwölf Karzinomen (17%) folgten im Caecum und Colon ascendens. In den anderen Darmabschnitten waren sie zu je 8% (jeweils ein Karzinom) verteilt. MSI-H

Karzinome waren in Caecum (50%, eines der beiden Karzinome), Colon transversum (33%, eines von drei Karzinomen) und Colon descendens (100%, ein Karzinom) zu finden.

Caecum, Sigma und Rektum beinhalteten je 25% (jeweils acht von 32 Karzinomen), das Colon ascendens 13% (vier von 32 Karzinomen), Colon transversum und descendens jeweils 6% (je zwei von 32 Karzinomen) der synchronen Dickdarmkarzinome. Mikrosatelliten instabile Karzinome traten in Caecum (drei der acht Karzinome (38%), davon zwei Karzinome (25%) MSI-H und ein Karzinom (13%) MSI-L), Colon ascendens (50%, zwei der vier Karzinome, beide MSI-H) und Sigma (13%, eines der acht Karzinome, MSI-L) auf.

Im Magen verteilten sich die Karzinome zu 8% (ein Karzinom) auf die Cardia, 46% (sechs Karzinome) auf den Korpus, 23% (drei Karzinome) auf das Antrum und 23% (drei Karzinome) auf den Pylorus, wobei die Karzinome in Corpus (50%, drei der sechs Karzinome) und Antrum (67%, zwei der drei Karzinome) MSI-H Karzinome waren.

Die häufigste Ursache der Mikrosatelliteninstabilität beim kolorektalen Karzinom stellt der Funktionsverlust von Mismatchreparagenen dar. In dieser Arbeit wurde die immunhistochemische Expression von hMLH1, hMSH2 und hMSH6 analysiert:

hMLH1 zeigte zu 25% (jeweils bei drei von zwölf Karzinomen) bei den metachronen Kolonkarzinomen und bei den Magenkarzinomen einen Verlust der Expression. hMSH2 und hMSH6 waren in keiner der drei Gruppen betroffen.

Alle Karzinome eines Organismus waren den gleichen Bedingungen ausgesetzt, zeigten aber nicht immer dasselbe genetische Muster:

Bei drei Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen waren bei gleicher MMR-Gen-Expression auch das gleiche Grading nachweisbar. Gleiche MMR-Gene verbunden mit gleichem pT-Stadium bot eine andere Patientin. Bei einer anderen Patientin differierten sowohl Grading als auch Staging bei gleicher Immunhistologie. Die Karzinome einer anderen Patientin wichen in hMLH1 voneinander ab.

Bei allen synchronen Kolonkarzinomen waren dieselben MMR-Expressionen ersichtlich. Drei Patientinnen wiesen zudem gleiches Grading und pT-Stadium ihrer Karzinome auf, zwei Patientinnen wichen bei gleichem Tumorstadium im Grading auseinander. Fünf Patientinnen hatten Karzinome mit gleichem Grading aber anderem

Staging inne, fünf weitere Patientinnen divergierten in anderem Grading und anderem Staging.

Die Magenkarzinome von drei Patientinnen unterschieden sich in hMLH1 bei gleichem Grading und pT-Stadium. Zwei Patientinnen hatten Karzinome mit gleichem Grading, Staging und MMR-Gen-Muster. Bei einer Patientin differierten die Karzinome in pT und Grading, bei gleicher Immunhistologie.

In Zusammenschau aller Daten ist davon auszugehen, dass bei vier Patientinnen mit metachronen Kolonkarzinomen die Doppelkarzinome durch chromosomale Instabilität entstanden, und bei einer Patientin die Karzinome durch Mikrosatelliteninstabilität ausgelöst worden sind. Bei einer weiteren Patientinnen ist es wahrscheinlich, dass jeweils ein Karzinom durch den Replication-Error- das andere Karzinom durch den Tumor-Suppressor-Pathway verursacht worden ist.

Die Doppelkarzinome von 14 Patientinnen mit synchronen Kolonkarzinomen sind vermutlich durch chromosomale Instabilität ausgelöst worden. Bei einer Patientin ist der Replication Error Pathway die wahrscheinlichste Karzinomursache (Mikrosatelliteninstabilität, proximale Lokalisation, aber immunhistochemisch kein MMR-Gen-Expressionsverlust).

Die Karzinomentstehung von drei Patientinnen mit synchronen Magenkarzinomen ist am ehesten auf chromosomale Instabilität zurückzuführen. Zwei Patientinnen wiesen Doppelkarzinome auf, von welchen eines durch chromosomale, das andere durch Mikrosatelliteninstabilität ausgelöst worden zu sein schien. Bei einer Patientin ist davon auszugehen, dass die Karzinome durch den Replication Error Pathway ausgelöst wurden, auch wenn bei einem der beiden Karzinome kein immunhistochemischer MMR-Gen-Expressionsverlust nachweisbar war.

Unsere Daten zeigen somit, dass die Karzinome nicht alle durch den gleichen Mechanismus verursacht werden: Es besteht somit eine unabhängige und simultane Karzinogenese. Der karzinogene Prozess kann also selbst in derselben Mikroumwelt und bei gleichem genetischen Hintergrund verschiedenen Wegen der Karzinomentwicklung folgen. Andererseits kann Mikrosatelliteninstabilität aber auch ein zufälliger Prozess sein, der die individuelle Klonalität – im Sinne einer permanenten Hintergrundinstabilität – des jeweiligen Karzinoms widerspiegelt.

VII. Literaturverzeichnis

- ¹ **Lynch HT.**, Lynch JF. (1994): 25 years of HNPCC. *Anticancer Res* 14:1617-1624
- ² **Warthin AS.** (1913): Hereditary with reference to carcinoma. *Arch Int Med* 13: 546-555
- ³ **Lynch HT.**, Shaw MW., Magnuson CW., Larsen AL., Krush AJ. (1966): Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. *Arch Int Med* 117: 206-212
- ⁴ **Vasen HF.**, Mecklin JP, Meera Kahn P., Lynch HT. (1991): The international Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34: 424-425
- ⁵ **Statistisches Bundesamt:** Gesundheitswesen, Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12/Reihe 4: Erschienen am 07.03.2005, aktualisiert am 15.03.05
- ⁶ **Öhmann U.** (1982): Colorectal carcinoma in patients less than 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 25: 209-214
- ⁷ **Wagner G.:** Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms. In: Frühmorgen P (Hrsg.) Prävention und Früherkennung des kolorektalen Karzinoms. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984, S. 1-6
- ⁸ **Waterhouse J.**, Muir C., Shanmugaratnam K., Powell J. (1982): Cancer incidence in five continents, vol IV. International Agency for Research on cancer, Lyon (IARC Scientific Publication, No 42)
- ⁹ **Becker N.** (Hrsg.): Krebsatlas der BRD 1981-1990. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1998
- ¹⁰ **Coleman MP.**, Estève J., Damiecki P., Arslan A., Renard H. (1993): Trends in Cancer Incidence and Mortality. IARC Scientific Publication no. 121, IARC, Lyon
- ¹¹ **Neugut AI.**, Hayek M., Howe G. (1996): Epidemiology of gastric cancer. *Semin. Oncol.* 23: 281-291
- ¹² **Nottingham J.** (1994): Signet-ring carcinoma of stomach in a child. *Histopathology* 24: 490-491
- ¹³ **Böttcher K.**, Becker K., Busch R., Roder DJ., Siewert JR. (1992): Prognosefaktoren beim Magenkarzinom. Ergebnisse einer uni- und multivariaten Analyse. *Chirurg* 63: 656-661
- ¹⁴ **Holburt E.**, Freedman SI. (1987): Gastric carcinoma in patients younger than age 36 years. *Cancer* 60: 1395-1399
- ¹⁵ **Antonioli DA.** (1994): Precursors of gastric carcinoma: a critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. *Hum Pathol* 25: 994-1005

- ¹⁶ **Muir CS.**, Harvey JC. (1997): Cancer of the stomach: overview. In: Sugimura T. and Sasako M.: Gastric Cancer. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 3-21
- ¹⁷ **Thomas RM., Sobin LH.** (1995): Gastrointestinal cancer. *Cancer* 75: 154-170
- ¹⁸ **Haenszel W.**, Kurihara M. (1968): Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Nat. Cancer Inst.* 40: 43-68
- ¹⁹ **Peinado MA.**, Malkhosyan S., Velazquez A., Perucho M. (1992): Isolation and characterisation of allelic losses and gains in colorectal tumours by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 10065-10069
- ²⁰ **Ionov Y.**, Peinado MA., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561
- ²¹ **Thibodeau SN.**, Bren G., Schaid (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819
- ²² **Fishel R.**, Lescoe MK., Rao MRS., Copland N., Jenkins N., Garber J., Kane M., Kolodner R. (1993): The human mutator gene homologue MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038
- ²³ **Peltomäki P.**, Aaltonen LA., Sistonen P., Pylkkänen L., Mecklin JP., Järvinen H., Green JS., Jass JR., Weber JL., Leach FS., Petersen GM., Hamilton SR., Chapelle A. de la., Vogelstein B (1993): Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260: 810-812
- ²⁴ **Jungck M.**, Friedl W., Propping P. (1999): Erblich bedingte gastrointestinale Tumorerkrankungen. *Internist* 40: 502-512
- ²⁵ **Vasen HF.**, Watson P., Mecklin JP., Lynch HT. (1999): New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116: 1453-1456
- ²⁶ **Rüschoff J.**, Dietmaier W., Luttges J., Seitz G., Bocker T., Zirngibl H., Schlegel J., Schackert HK., Jauch KW., Hofstädter F. (1997): Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol* 150: 1815-1825
- ²⁷ **Thibodeau SN.**, French AJ., Cunningham JM., Tester D. Burgart LJ., Roche PC., McDonnell SK., Schaid DJ., Vockley CW., Michels VV., Farr GH. Jr., O'Connell MJ. (1998): Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 58: 1713-1718

- ²⁸ **Lambert Ch.**, Caspari R., Friedl W., Sauerbuch T., Propping P. (1996): Erbliches Kolonkarzinom: Symptomatik, Diagnostik und Krebsvorsorge. Dtsch Ärztebl 93: 1094-1099
- ²⁹ **Umar** (2003): Diagnostic Guidelines for Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer and Microsatellite Instability. Eingereicht: J Nat Cancer Inst
- ³⁰ **Rümmele P.**, Bataille F., Hofstädter F., Dietmaier W. (2003): Molekularbiologie und Molekularpathologie des kolorektalen Karzinoms. Onkologie 2003 9: 807-818
- ³¹ **Boeing H.** (1991): Epidemiological research in stomach cancer: progress over the last ten years. J Cancer Res Clin Oncol 117: 133-143
- ³² **Leiß O.** (1995): Pathogenese des Magenkarzinoms – Bedeutung von Nitraten, N-Nitroso-Verbindungen, Nahrungsfaktoren und einer Helicobacter pylori induzierten chronisch-aktiven und chronisch-atrophischen Gastritis. J Gastroenterol 33: 173-179
- ³³ **Inoue M.**, Tajima K., Hirose K. (1994): Life-style and subsidence of gastric cancer – joint effect of smoking and drinking habits. Int J Cancer 56: 494-499
- ³⁴ **Correa P.** (1992): Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – first American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 52: 6735-6740
- ³⁵ **Blaser MJ.**, Perez-Perez GI., Kleanthous H., Cover TL., Peek RM., Chyou PH., Stemmermann GN., Nomura A. (1995): Infection with Helicobacter pylori strains possessing cag A is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res 55: 2111-2115
- ³⁶ **Forman D.** (1998): Helicobacter pylori infection and cancer. Br. Med. Bull., 54, 71-78
- ³⁷ **Cahill R.**, Sant S., Beattie S. (1995): Helicobacter pylori and increased epithelial cell proliferation: a risk factor for cancer. Europ J Gastroenterol Hepatol 6: 1123-1127
- ³⁸ **Remmele W.** (Hrsg.), Pathologie 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 656
- ³⁹ **Remmele W.** (Hrsg.), Pathologie 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 659-660
- ⁴⁰ **Borrmann R.**: Geschwülste des Magens und Duodenums. In: Henke F., Lubarsch O. (Hrsg.): Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd I/1. Springer, Berlin, 1926, S. 812-1064
- ⁴¹ **Thomas C.** (Hrsg.): Spezielle Pathologie Schattauer, Stuttgart; New York, 1996, S. 228

- ⁴² **Sobin LH.**, Wittekind C. (1997): TNM-Classification of Malignant Tumours. Wiley-Liss-Verlag, Toronto 1997⁵
- ⁴³ **Laurén F.** (1965): The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt of histoclinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 64: 31-40
- ⁴⁴ **Ming S-C.** (1977): Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer 39: 2475-2485
- ⁴⁵ **Remmele W.** (Hrsg.), Pathologie 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 344
- ⁴⁶ **Watanabe H.**, Jass JR., Sobin LH., in collaboration with pathologists in eight countries (Hrsg.): Histological typing of oesophageal and gastric tumours. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1990²
- ⁴⁷ **Giedl J.**, Hermanek P., Husemann B. (1980): Häufigkeit und Typ der lymphogenen Metastasierung des Magenkrebses. Langenbecks Arch Chir 350: 191-197
- ⁴⁸ **Harrison JD.**, Fielding JWL. (1995): Prognostic factors for gastric cancer influencing clinical practice. World J Surg 19: 496-500
- ⁴⁹ **Maruyama K.**, Okabayashi K., Kinoshita T. (1987): Progress in cancer surgery in Japan and its limits of radicality. World J Surg 11: 418-425
- ⁵⁰ **Jäger E.**, Knuth A. (1995): Adjuvante und palliative Chemotherapie des Magenkarzinoms. Dtsch Med Wochenschr 120: 491-497
- ⁵¹ **Ohno S.**, Tomisaki S., Oiwa H. (1995): Clinicopathologic characteristics and outcome of adenocarcinoma of the human gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. J Am Coll Surg 180: 577-582
- ⁵² **Burns FJ.** (1980): Synchronous and metachronous malignancies of the colon and rectum. Dis Colon Rectum 23: 578-579
- ⁵³ **Welch JP.** (1981): Multiple colorectal tumours. An appraisal of natural history and therapeutic options. Am J Surg 142: 274-280
- ⁵⁴ **Masubuchi S.**, Konishi F., Togashi K., Okamoto T., Senba S., Shitoh K., Kashiwagi H., Kanazawa K., Tsukamoto T. (1999): The Significance of Microsatellite Instability in Predicting the Development of Metachronous Multiple Colorectal Carcinomas in Patients with Nonfamilial Colorectal Carcinoma. Cancer 85(9): 1917-1924
- ⁵⁵ **Remmele W.** (Hrsg.), Pathologie 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 649

- ⁵⁶ **Lynch HT.**, Watson P., Lanspa SJ., Marcus J., Smyrk T., Fitzgibbons RJ. Jr., Kriegl M., Lynch JF. (1988): Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 31: 439-444
- ⁵⁷ **Wang H.**, Huang X., Wang Y. (1995): Multi-primary colorectal carcinoma. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih* 1995 Dec; 33 (12): 765-767
- ⁵⁸ **Soravia C.**, Egeli RA., Obradovic M., Ambrosetti P., Marti MC., Raymond L., Rohner A. (1993): Multiple tumours of colon and rectum. *Schweiz Med Wochenschr* 1993 Apr 3; 123 (13): 570-572
- ⁵⁹ **Honmyo U.**, Misumi A., Murakami A. (1989): Clinicopathological analysis of synchronous multiple gastric carcinoma. *Eur Surg Oncol* 15: 316-321
- ⁶⁰ **Marrano D.**, Viti G., Grigoni W. (1987): Synchronous and metachronous cancer of the stomach. *Eur J Surg Oncol* 13: 493-498
- ⁶¹ **Esaki Y.**, Hirokawa K., Yamashiro M. (1987): Multiple gastric cancers in the aged with special reference to intramucosal cancers. *Cancer* 59: 560-565
- ⁶² **Miyoshi E.**, Haruma K., Hiyama T., Tanaka S., Yoshihara M., Shimamoto F., Chayama K. (2001): Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 95: 350-353
- ⁶³ **Wright PA.**, Williams GT. (1993): Molecular biology in gastric carcinoma. *Gut* 34: 145-147
- ⁶⁴ **Ochiai A.**, Hirohashi S. (1997): Multiple genetic alterations in gastric cancer. In: Sugimura T. and Sasako M. (eds): *Gastric Cancer*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 87-99
- ⁶⁵ **Hesketh R.** (1997): *The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Facts Book*. Academic Press, San Diego, CA.
- ⁶⁶ **Tahara E.** (1993): Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 265-272
- ⁶⁷ **Morson B.** (1974): President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 67: 451-457
- ⁶⁸ **Remmele W.** (Hrsg.), *Pathologie 2 Verdauungstrakt*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 637 f., Tabellen 7.27, 7.28
- ⁶⁹ **Gillespie PE.**, Chambers TJ., Chan KW., Doronzo F., Morson BC., Williams CB. (1979): Colonic adenomas – a colonoscopic survey. *Gut* 20: 240-245

- ⁷⁰ **Remmele W.** (Hrsg.), Pathologie 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996², S. 637 f., Tabellen 7.27, 7.28
- ⁷¹ **Fearon ER.**, Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-767
- ⁷² **Vogelstein B.**, Fearon ER., Hamilton SR. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumour development. N Engl J Med 319: 525-532
- ⁷³ **Fearon ER.**, Cho KR, Nigro JM (1990): Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247: 49-56
- ⁷⁴ **Boland CR.**, Sato J., Appelman HD. (1995): Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. Nature Med 1: 902-909
- ⁷⁵ **Morrin M.**, Kelly M., Barrett N. (1994): Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance. Gut 35: 1627-1631
- ⁷⁶ **Tamura G.**, Sakata K., Maesawa C. (1995): Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res 55: 1933-1936
- ⁷⁷ **Bocker T.**, Rüschoff J., Fishel R. (1999): Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. Biochim Biophys Acta 1423: O1-O10
- ⁷⁸ **Weber JL.**, May PE. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44: 388-396
- ⁷⁹ **Kunkel TA.** (1990): Misalignment-mediated DNA synthesis errors. Biochemistry 29: 8003-8011
- ⁸⁰ **Leung SY.**, Yuen ST., Chung LP., Chu KM., Chan ASY., Ho JCI. (1999): hMLH1 promotor methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. Cancer Res 59: 159-164
- ⁸¹ **Rüschoff J.**, Mehringer S., Beyser K., Dietmaier W., Langner C., Bocker T., Kullmann F. (1999): Korrelation zwischen Histologie und molekularen Mechanismen der Karzinogenese beim Magenkarzinom. Verh. Dtsch. Ges. Path. 83: 71-78
- ⁸² **Rüschoff J.**, Dietmaier W., Bocker T., Wallinger S., Kullmann F., Beham A., Hofstädter F. (1998): Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. Pathologe 19: 269-278
- ⁸³ **Knudson AG.** (1996): Hereditary cancer: two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 122: 135-140

- ⁸⁴ **Knudson AG.** (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. PNAS 68: 820-823
- ⁸⁵ **Aaltonen LA.,** Peltomäki P., Leach FS., Sistonen P., Pylkkänen L., Mecklin JP., Järvinen H., Powell SM., Jen J., Hamilton SR., Petersen GM., Kinzler KW., Vogelstein B., Chapelle A. de la (1993): Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. Science 260: 812-816
- ⁸⁶ **Rüschoff J.,** Bocker T., Schlegl J., Stumm G., Hofstädter F. (1995): Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. Virchows Arch. 426: 215-222
- ⁸⁷ **Young J.,** Leggett B., Gustafson C., Ward M., Searle J., Thomas L., Buttenshaw R., Chenevix-Trench G. (1993): Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas. Hum Mutat 2: 351-354
- ⁸⁸ **Markowitz S.,** Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan RS., Zborowska E., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268: 1336
- ⁸⁹ **Gryfe R.,** Kim H., Hsieh ET., Aronson MD., Holowaty EJ., Bull SB., Redston M., Gallinger S. (2000): Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med 342: 69
- ⁹⁰ **Diep CB.,** Thorstensen L., Meling GI., Skovlund E., Rognum TO., Lothe RA. (2003): Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. J Clin Oncol 21: 820
- ⁹¹ **Elsaleh H.,** Iacopetta B. (2001): Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. Clin Colorectal Cancer 1: 104
- ⁹² **Liang JT.,** Huang KC., Lai HS., Lee PH., Cheng YM., Hsu HC., Cheng AL., Hsu CH., Yeh KH., Wang SM., Tang C., Chang KJ. (2002): High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. Int J Cancer 101: 519
- ⁹³ **Ribic CM.,** Sargent DJ., Moore MJ., Thibodeau SN., French AJ., Goldberg RM., Hamilton SR., Laurent-Puig P., Gryfe R., Shepherd LE., Tu D., Redstone M., Gallinger S. (2003): Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. N. Engl J Med 349: 247-257

- ⁹⁴ **Lothe RA.**, Peltomäki P., Meling GI., Aaltonen LA., Nyström-Lathi M., Pylkkänen L., Heimdal K., Andersen TI., Møller P., Rognum TO., Fossa SD., Haldorsen T., Langmark F., Brøgger A., Chapelle A. de la, Børresen AL. (1993): Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53: 5849-5852
- ⁹⁵ **Bocker T.**, Schlegel J., Kullmann F., Stumm G., Zirngibl H., Epplen JT., Rüschoff J. (1996): Genomic instability in colorectal carcinomas: comparison of different evaluation methods and their biological significance. *J Pathol* 178: 15-19
- ⁹⁶ **Han HJ.**, Yanagisawa A., Kato Y., Park JG., Nakamura Y. (1993): Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 53: 5087-5089
- ⁹⁷ **Rhyu MG.**, Park WS., Meltzer SJ. (1994): Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 9: 29-32
- ⁹⁸ **Chong JM.**, Fukayama M., Hayashi Y., Takizawa T., Koike M., Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Miyaki M. (1994): Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 54: 4595-4597
- ⁹⁹ **Boland CR.**, Sato J., Saito K., Carethers JM., Marra G., Laghi L., Chauhan DP. (1998): Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev* 22: 377-382
- ¹⁰⁰ **Boland CR.**: Neoplasia of the gastrointestinal tract. In: Yamada T., Alpers DH. Owyang C., eds. *Textbook of gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott; 1995²: 578-595
- ¹⁰¹ **Pellman D.**, 5513 (2001): Cancer. A CINtillating new job for the APC tumour suppressor. *Science* 291: 2555-2556
- ¹⁰² **Perucho M.** (1996): Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 377: 675-684
- ¹⁰³ **Lynch HT.**, de la Chapelle A. (2003): Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348: 919
- ¹⁰⁴ **Peltomäki P.**, Vasen HF. (1997): Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 113: 1146-1158
- ¹⁰⁵ **Tyler-Smith C.**, Willard HF. (1993): Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev*, 3: 390-397

- ¹⁰⁶ **Goelz SE.**, Hamilton SR., Vogelstein B. (1985): Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin-embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 118-126
- ¹⁰⁷ **Greer CE.**, Peterson SL., Kiviat NB., Manos MM. (1991): PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 95: 117-124
- ¹⁰⁸ **White TJ.**, Arnheim N., Ehrlich HA. (1989): The Polymerase chain reaction. *Trends Genet* 5:185-189
- ¹⁰⁹ **Shibata D.**, Hawes D., Li ZH., Hernandez AM., Spruck CH., Nichols PW. (1992): Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. *Am J Oathol* 141: 539-543
- ¹¹⁰ **Mullis KB.**, Faloona FA., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
- ¹¹¹ **MartinWJ.** (1991): Polymerase chain reaction: a tool for the modern pathologist. In: Fenoglio-Preiser CM., Willman CL. (Hrsg.): *Molecular diagnostics in Pathology. Techniques in diagnostic pathology* (1); Williams and Wilkins; Baltimore; Hongkong; London; 21-80
- ¹¹² **Dietmaier W.**, Wallinger S., Bocker T., Kullmann F., Fishel R., Rüschoff J. (1997): Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression. *Cancer Res* 57: 4749-4756
- ¹¹³ **Bender P.**, Hoover M., Byar J., Leonard J., Beck JC. (1997): Representative whole genome amplification. *Am J Hum Genet* 61 (2): A 231
- ¹¹⁴ **Dietmaier W.**, Hartmann A., Wallinger S., Heinmöller E., Kerner T., Endl E., Jauch K.-W., Hofstädter F., Rüschoff J. (1999): Multiple Mutation Analysis in Single Tumor Cells with Improved Whole Genome Amplification. *Am J Pathol*, 154: 83-95
- ¹¹⁵ **Sambrook J.**, Fritsch EF., Maniatis T.: *Molecular cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor; New York, 1989²
- ¹¹⁶ **Kwok S.**, Higuchi R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238
- ¹¹⁷ **Boland CR.**, Thibodeau SN., Hamilton SR., Sidransky D., Eshleman JR., Burt RW., Meltzer SJ., Rodriguez-Bigas MA., Fodde R., Ranzani GN., Srivastava S. (1998): A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the

- Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 58: 5248
- ¹¹⁸ **HNPCC Microsatellite Instability Test**, Instruction Manual, Version 1, 1998, S.24
- ¹¹⁹ **Palombo F.**, Gallinari P., Iccarino I (1995): GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 268: 1912-1914
- ¹²⁰ **Leung SY.**, Yuen ST., Chung LP., Chu KM., Chan ASY., Ho JCI. (1999): hMLH1 promotor methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 159-164
- ¹²¹ **Rüschoff J.**, Mehringer S., Beyser K., Dietmaier W., Langner C., Bocker T., Kullmann F. (1999): Korrelation zwischen Histologie und molekularen Mechanismen der Karzinogenese beim Magenkarzinom. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 83: 71-78
- ¹²² **Berg JW.**, Howell MA. (1974): The geographic pathology of bowel cancer. *Cancer* 13: 807
- ¹²³ **Golematis B.**, Tzardis P., Hatzikostas P (1990): Changing Pattern of distribution of carcinoma of the stomach, *Br J Surg* 77: 63-64
- ¹²⁴ **Burns FJ.** (1980): Synchronous and metachronous malignancies of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 23: 578-579
- ¹²⁵ **Kim HS.**, Cho NB., Yoo JH., Shin KH., Park JG., Kim YI., Kim WH. (2001): Microsatellite instability in double primary cancers of the colorectum and the stomach. *Mod Pathol* 14(6): 543-548
- ¹²⁶ **Wanebo HJ.**, Kennedy BJ., Chmiel J. (1993): Cancer of the stomach: a patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 218: 583-592
- ¹²⁷ **Halling KC.**, Harper J., Moskaluk CA., Thibodeau SN., Petron GR., Yustein AS., Tosi P., Minacci C., Roviello F., Piva P., Hamilton SR., Jackson CE., Powell SM (1999): Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 155: 205-211
- ¹²⁸ **Wu MS.**, Lee CW., Shun CT., Wang HP., Lee WJ., Sheu JC., Lin JT (1998): Clinicopathological significance of altered loci of replication error and microsatellite instability associated mutations in gastric cancer. *Cancer Res* 58 (7): 1494-1497
- ¹²⁹ **Shiao YH.**, Bovo D., Guido M., Capella C., Cassaro M., Busatto G., Russo V., Sidoni A., Parenti AR., Rugge M. (1999): Microsatellite instability and/or loss of heterozygosity in young gastric cancer patients in Italy. *Int J cancer* 82 (1): 59-60

- ¹³⁰ **Schlegel J.**, Bocker T., Zirngibl H., Hofstädter F., Rüschoff J. (1995): Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. *Virchows Arch* 426: 223-227
- ¹³¹ **Brown SR.**, Finan PJ., Hall NR., Bishop DT. (1998): Incidence of DNA replication errors in patients with multiple primary cancers. *Dis Colon Rectum* 41: 765-769
- ¹³² **Yamashita K.**, Arimura Y., Kurokawa S., Itoh F., Endo T., Hirata K., Imamura A., Kondo M., Sato T., Imai K. (2000): Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut* 46 : 790-794
- ¹³³ **Goel A.**, Arnold CN., Niedzwiecki D., Chang DK., Ricciardiello L., Carethers JM., Dowell JM., Wasserman L., Compton C., Mayer RJ., Bertagnolli MM., Boland CR. (2003): Characterisation of Sporadic Colon Cancer by Patterns of Genomic Instability. *Cancer Res* Apr 1; 63 (7): 1608-1614
- ¹³⁴ **Kang GH.**, Yoon GS., Lee HK., Kwon YM., Ro JY. (1999): Clinicopathologic characteristics of replication error-positive gastric carcinoma. *Mod Pathol* 12: 15-20
- ¹³⁵ **Kim HS.**, Woo DK., Bae SI., Kim YI., Kim WH. (2000): Microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Lab Invest* 80: 57-64
- ¹³⁶ **Fang DC.**, Jass JR., Wang DX., Zhou XD., Lou YH., Young J. (1999): Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Clin Pathol* 52 (7): 504-508
- ¹³⁷ **Chung YJ.**, Song JM., Lee JY., Jung YT., Seo EJ., Choi SW., Rhyu MG. (1996): Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high risk population. *Cancer Res* 56(20): 4662-4665
- ¹³⁸ **Nakashima H.**, Honda M., Inoue H., Shibuta K., Arinaga S., Era S., Ueo H., Mori M., Akiyoshi T. (1995): Microsatellite instability in multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 64: 239-242
- ¹³⁹ **Yamashita K.**, Arimura Y., Kurokawa S., Itoh F., Endo T., Hirata K., Imamura A., Kondo M., Sato T., Imai K. (2000): Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut* 46 : 790-794
- ¹⁴⁰ **Strickler JG.**, Zheng J., Shu QP., Burgart LJ., Alberts SR., Shibata D. (1994): p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res* 54: 4750-4755

- ¹⁴¹ **Dos Santos NR.**, Seruca R., Constância M., Seixas M., Sobrinho-Simoes M. (1996): Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 110: 38-44
- ¹⁴² **Keller G.**, Rotter M., Vogelsang H., Bischoff P., Becker KF., Mueller J., Brauch H., Siewert JR., Höfler H. (1995): Microsatellite instability in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. Relation to clinicopathological data and family history. *Am J Pathol* 147: 593-600
- ¹⁴³ **Lin JT.**, Wu MS., Shun CT., Lee WJ., Wang JT., Wang TH., Sheu JC. (1995): Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur J Cancer* 31A: 1879-1882
- ¹⁴⁴ **Ohmura K.**, Tamura G., Endoh Y., Sakata K., Takahashi T., Motoyama T. (2000): Microsatellite alliterations in differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach with special reference to cellular phenotype. *Hum Pathol* 31 (9): 1031-1035
- ¹⁴⁵ **Bae I.S.**, Park JG., Kim YI., Kim WH. (2000): Genetic alterations in gastric cancer cell lines and their original tissues. *Int. J. Cancer* 87: 512-516
- ¹⁴⁶ **Kimura T.**, Sato H., Manabe R., Konishi H., Kushima R., Sugihara H., Hattori T., Kodama T., Kashima K. (1997): Analysis of microsatellite regions and DNA ploidy pattern in signet ring cell carcinomas of the stomach. *Gan To Kagaku Rhyoho* 24: 273-278
- ¹⁴⁷ **Stadtländer CT.**, Waterbor JW. (1999): Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 20 (12): 2195-2208
- ¹⁴⁸ **Chung YI.**, Kim KM., Choi JR., Choi SW., Rhyu MG. (1999): Relation between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. *Int J Cancer* 82: 782-788
- ¹⁴⁹ **Choi SW.**, Park SW., Lee KY., Kim KM., Chung YJ., Rhyu MG. (1998): Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene* 17 (20): 2655-2659
- ¹⁵⁰ **Rüschoff J.**, Dietmaier W., Bocker T., Wallinger S., Kullmann F., Beham A., Hofstädter F. (1998): Molekulare Krebsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. *Pathologe* 19: 269-278
- ¹⁵¹ **Enker WE.**, Dragacevic S. (1978): Multiple carcinomas of the large bowel: a natural experiment in aetiology and pathogenesis. *Ann Surg* 187: 8-11

- ¹⁵² **Rennert G.**, Robinson E., Rennert HS., Neugut AI. (1995): Clinical characteristics of metachronous colorectal tumours. *Int J Cancer* 60: 743-747
- ¹⁵³ **Fante R.**, Roncucci L., Di Gregorio C., Tamassia MG., Losi L., Penatti P. (1996): Frequency and clinical features of multiple tumours of the large bowel in the general population and in patients with hereditary colorectal carcinoma. *Cancer* 77: 2013-2021
- ¹⁵⁴ **Lynch HT.**, Watson P., Kriegler M., Lynch JF., Lanspa SJ., Marcus J. (1988): Differential diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome I and Lynch syndrome II). *Dis Colon rectum* 31: 372-377
- ¹⁵⁵ **Pedroni M.**, Tamassia MG., Percesepe A., Roncucci L., Benatti P., Lanza G Jr., Gafa R, Di Gregorio C., Fante R., Losi L., Gallinari L., Scorcioni F., Vaccina F., Rossi G., Cesinaro AM., Ponz de Leon M. (1999): Microsatellite instability in multiple colorectal tumours. *Int J Cancer* 81(1): 1-5
- ¹⁵⁶ **Rodriguez-Bigas MA.**, Boland CR., Hamilton SR. et al. (1997): Commentary. A national Cancer Institute workshop on hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome: Meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of National Cancer Institute* 89: 1758-1762
- ¹⁵⁷ **Sedivy B.**, Wolf B., Kalipciyan M., Steger GG., Karner-Hanusch J., Mader RM. (2000): Genetic analysis of multiple synchronous lesion of the adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Cancer* 82 (7): 1276-1282

VIII. Anhang**8.1 Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin (Purinbase)
a bzw. (a)	bei Vorliegen eines zweiten LOHs ist das andere Allel als beim ersten LOH betroffen
Abb.	Abbildung
Ad	Adenom
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
Cas	Karzinome
Chr. 5/C 5	Chromosom 5
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp
CIN	chromosomale Instabilität
CRC	kolorektales Karzinom
d.h.	das heißt
dATP	2'-Desoxyadenin-5'-Triphosphat (Nukleotid)
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat (Nukleotid)
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat (Nukleotid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat (Nukleotid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin (Purinbase)
G1-3	Grading
h/het./(h)	heterogen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
IH	Immunhistochemie
KRK	kolorektales Karzinom
Lk	Lymphknoten
LOH	Loss of Heterozygosity

Lsg.	Lösung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
MMRP/MMR-Protein	Mismatch-Repair-Protein
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	high MSI tumour
MSI-L	low MSI tumour
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p-Arm	kurzer Arm des Chromosoms
Pat.	Patientin/nen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEP-PCR	Primer Extension Preamplification PCR
PET	Paraffin embedded tissue
pTNM	Tumor/Nodus/Metastase (pathol. Tumorklassifikation)
q-Arm	langer Arm des Chromosoms
sec	Sekunde
T	Thymin (Pyrimidinbase)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organisation
µl	Mikroliter

Sonderzeichen in Tabellen:

■	MSI
o	LOH

8.2 Lebenslauf

Name: U l r i c h
Vorname: Nicole

geb.: 14.12.1977
Geb.-Ort: Weiden

Wohnort: Am Eichenhain 12
92224 Amberg

Eltern:

Vater: Klaus Ulrich
Mutter: Christa Ulrich

Schul Ausbildung:

Sept. 1984 - Juli 1988

Grundschule: Pestalozzischule, Weiden

Sept. 1988 - Juli 1997

Abschluss: Elly-Heuss-Gymnasium, Weiden
Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Beruflicher Werdegang:

Studium der Humanmedizin:
Nov. 1997-1999

Vorklinische Ausbildung an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Sept. 1999

Ärztliche Vorprüfung

1999-2003

Klinische Ausbildung an der
Medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg,
Universitätsklinikum Regensburg

Aug. 2000

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Aug. 2002

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Okt. 2003

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Jan. 2004 - Sept. 2004

ÄiP in der Pädiatrie, Klinikum Weiden

01.10.2004

Approbation als Ärztin

Okt. 2004 - Juli 2005
seit Aug. 2005

Assistenzärztin in der Pädiatrie, Weiden
Assistenzärztin in der Pädiatrie, Amberg

Weiterbildungsschwerpunkte:

Neuropädiatrie und Neonatologie

8.3 Danksagung

Allen, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. F. Hofstädter für die Überlassung des Themas.

Auch möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. F. Bataille für die fachliche Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. med. P. Rümmele für die Korrekturanregungen.

Ebenso Dank an MTA J. Förster, MTA D. Gaag, MTA S. Troppmann und MTA E. Weber für die technischen Hilfestellungen und die praktischen Tipps.